UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1942-1943 N° 317

Contribution à l'Etude Bibliographique de l'Acide Ascorbique

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Avril 1943
à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg
pour obtenir le grade
de Docteur de l'Université de Strasbourg
(Mention Pharmacie)

PAR

René VIRLOGEUX

Pharmacien de 1re Classe de l'Université de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse : M. P. CORDIER, Professeur, Président.
M. A. SARTORY, Professeur
M. Y. VOLMAR, Professeur
} Juges

SAINT-ÉTIENNE
IMPRIMERIE DE « LA LOIRE RÉPUBLICAINE »
16, Place Marengo, 16

1943

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1942-1943 — N° 317

Contribution à l'Etude Bibliographique de l'Acide Ascorbique

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Avril 1943
à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg
pour obtenir le grade
de Docteur de l'Université de Strasbourg
(Mention Pharmacie)

PAR

René VIRLOGEUX

Pharmacien de 1re Classe de l'Université de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse : M. P. CORDIER, Professeur, Président. — M. A. SARTORY, Professeur — M. Y. VOLMAR, Professeur — Juges

SAINT-ÉTIENNE
IMPRIMERIE DE « LA LOIRE RÉPUBLICAINE »
16, Place Marengo, 16

1943

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ❀, C. ⚕
VOLMAR, *Assesseur*, ✻, I. ❀.
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ⚕, ⚕, ❀.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ❀, ⚕.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C.✻, I. ❀, C. ⚕.	Bactériologie.
	LAVIALLE, ✻, I. ❀, ⚕	Botanique.
	VOLMAR, ✻, I. ❀.	Chimie organique.
	GUILLAUME, O. ✻, ⚕, I. ❀, ⚕	Pharmacie galénique.
	LAPP, I. ❀.....	Chimie analytique.
	CORDIER, ❀.	Pharmacie chimique.
	R. SARTORY, ❀, ⚕	Matière médicale.

MAITRE DE CONFERENCE

M.	DUQUENOIS	Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ❀, ⚕.

COURS COMPLEMENTAIRES

MM.	A. SARTORY.....	Hygiène.
	LAVIALLE	Hydrologie.
	VOLMAR	Chimie minérale.
	GUILLAUME	Zoologie.
	LAPP	Physique.
	PRÉLOT	Législation et Déontologie.
	CORDIER	Chimie biologique.
	R. SARTORY	Cryptogamie.
	Mme LALLEMAND, ❀	Pharmacodynamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, ✠ ⚕, I. ❀	Chimie pharmaceutique.
	Mme LALLEMAND, ❀.....	Chimie et Physique.
	JÆGER.....	Histoire naturelle.
	LEDOUX, ✻.....	Bactériologie et Parasitologie.

A LA MEMOIRE DE MA GRAND'MERE

A MES PARENTS

Faible témoignage de ma grande affection et de ma profonde reconnaissance.

A MA FEMME

A MA FILLE

A MON PARRAIN

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CORDIER

PROFESSEUR DE PHARMACIE CHIMIQUE
ET DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR SARTORY

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR DE BACTÉRIOLOGIE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR VOLMAR

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR DE CHIMIE ORGANIQUE
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

AVANT-PROPOS

Vouloir consacrer une thèse à un sujet comme celui que nous avons choisi est une entreprise qui demande une justification.

L'exigüité des locaux dans lesquels a dû se replier la Faculté de Strasbourg interdisait à notre Maître, Monsieur le Professeur CORDIER, *de prendre un nouvel élève dans son laboratoire. Toutefois, devant notre insistance, il nous fit le grand honneur de nous charger d'un petit travail de mise au point sur un sujet d'actualité.*

De très nombreux mémoires ont été publiés, tant en France qu'à l'étranger, sur la vitamine C. De longues recherches bibliographiques nous ont permis de prendre connaissance de la plupart de ces publications. Nous avons pu constater alors qu'il n'existait pratiquement aucun ouvrage qui traitât ce sujet d'une façon complète. Ici, nous trouvons un procédé d'extraction, là une synthèse, ailleurs une méthode de dosage, etc... Devant une telle dispersion, il est assez difficile d'avoir une vue d'ensemble sur la question. Nous avons pensé alors qu'une monographie condensant l'état actuel de nos connaissances sur la vitamine C pourrait avoir son utilité pratique.

Notre étude est à la fois un travail d'analyse et de synthèse. Analyse, parce que nous avons pu consulter, puis classer, une abondante documentation. Synthèse, parce que nous nous sommes efforcés d'extraire de tous ces articles la « substantifique moelle » afin de mettre en lumière les parties essentielles de la question.

Faciliter la tâche de celui qui, avant de se livrer à des recherches sur un point particulier, veut avoir une idée précise du problème, tel a été le principe qui nous a guidé.

Avant d'aborder l'exposé de cette étude, notre premier

devoir est d'exprimer nos remerciements à tous ceux qui ont dirigé notre formation intellectuelle.

Nos Maîtres de l'Ecole de Pharmacie de Clermont-Ferrand nous ont initié avec bienveillance à l'art pharmaceutique.

Plus tard, nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, par leur remarquable enseignement, ont su développer en nous l'amour de la science et le goût de la recherche.

Enfin, nous remercierons plus particulièrement encore Monsieur le Professeur CORDIER, *dont les directives et les conseils nous furent si précieux pour mener à bien notre travail.*

NOTE

relative à la documentation

Notre documentation, pour abondante qu'elle soit, n'en demeure pas moins très incomplète. Nous nous excusons en particulier d'avoir dû limiter notre bibliographie se rapportant aux années de la guerre. Les circonstances actuelles, en effet, nous ont souvent empêché de prendre connaissance de nombreuses revues étrangères parues depuis 1940. Nous le regrettons vivement et nous espérons, toutefois, que cette lacune ne sera pas trop préjudiciable à l'actualité de notre exposé.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Le scorbut est sans doute l'une des affections les plus anciennement connues. L'homme de la préhistoire, grâce à une alimentation riche et variée, n'a pas dû en souffrir. Par contre, la maladie se manifesta sans doute quand l'homme, se civilisant peu à peu, eut l'idée de faire des provisions, et d'agrémenter son menu en faisant subir à ses aliments des opérations diverses : cuisson, salaison, fermentation, séchage, etc...

Les premières descriptions du scorbut nous sont données par HIPPOCRATE, qui parle d'un mal caractérisé par d'abondantes et fréquentes hémorragies, une ulcération des gencives et une obstruction de la rate. PLINE l'Ancien signale sous le nom de *stomacace* (du grec στομαχαχη = maladie de la bouche), une affection qui décima les légions de GERMANICUS, sur le Rhin, et il explique comment les soldats de CATALICUS parvenaient à s'en guérir en ingérant des feuilles vertes de Rumex.

Plus tard, au XIII[e] siècle, les chroniques de JOINVILLE nous offrent un tableau saisissant de ce fléau. Retraçant les souffrances endurées par l'armée de SAINT LOUIS en Egypte, pendant la huitième croisade, il nous parle des malheureux chevaliers dont la chair pourrie tombait en lambeaux.

Plus connu sous le nom de « mal des navigateurs », le scorbut guettait surtout les marins et ceux-ci lui payèrent un lourd tribut. En effet, les vaisseaux à voiles, soumis aux caprices de la mousson ou des alizés, étaient souvent obligés de tenir la mer pendant des semaines avant d'aborder une terre où l'on puisse se ravitailler. Les provisions de bord,

composées de salaisons et de légumes secs, ne manquaient pas de provoquer des troubles graves et même mortels parmi l'équipage astreint trop longtemps à ce régime. Ainsi, en 1498, Vasco de Gama, lors de son expédition autour du cap de Bonne-Espérance, vit périr du scorbut une centaine de ses hommes.

C'est probablement vers cette époque (XV^{e} siècle) que les Hollandais, navigateurs audacieux, nommèrent ce mal « scheurbuik » (du danois skjoerbug = déchirement de la bouche). De là provient le mot français « scorbut ».

En 1535, Jacques Cartier, partant au Canada pour la seconde fois, perdit plus de vingt hommes. Heureusement, le reste de l'équipage, débarqué à Terre-Neuve, fut guéri par les indigènes qui soignèrent les marins en leur administrant une décoction d'aiguilles de sapin. Notons en passant que nous devons à Jacques Cartier une description complète et détaillée de la première autopsie d'un scorbutique.

En 1552, c'est la terrible épidémie qui dévaste l'armée de Charles-Quint au siège de Metz.

En 1593, l'amiral Richard Hawkins rapporte des observations sur plusieurs cas de scorbut qui se sont déclarés parmi ses matelots, alors qu'il naviguait dans les mers du Sud. Le premier, il remarque tout spécialement l'action curative du jus de citron.

Vers cette époque, de nombreux médecins s'intéressèrent à cette maladie qui connut, on ne sait trop pourquoi, une sorte de vogue. On publia des traités décrivant avec force détails les causes et surtout les symptômes de cette affection. On indiquait même le traitement grâce à une longue liste de produits anti-scorbutiques. Mais tout cela n'apportait pas grand chose de nouveau.

C'est Nicolas Venette qui, après avoir étudié la question dans un traité publié en 1671, sut poser le problème d'une façon claire et précise, permettant ainsi d'orienter les recherches méthodiquement. Il montra que la cause essentielle du scorbut résulte de l'absence de végétaux frais dans l'alimentation :

« En Norvège et dans les pays du Septentrion, on envoye « les Scorbutiques dans les bois pour y manger des meures « des fraises et des framboises. Ils n'en retournent point « que leur maladie ne soit beaucoup diminuée... La cerize

« aigre, le citron, l'orange, la grenade et les grozelles sont « aussi des fruits antiscorbutiques (p. 27-28). On pourra « mêler ce remède avec un peu de conserve de rapure « d'orange ou de citron, parce que ces fruits ont cela de « propre qu'ils sont directement opposés aux causes du « scorbut (p. 217) ». (1)

Le Hongrois KRAMER (1720) puis le Suédois BACHSTRÖM (1734) viennent confirmer ces faits. Ce dernier relate l'histoire d'un marin qui, atteint du scorbut, fut mis à l'écart dans une chaloupe. Mais s'étant aperçu que le fond de son embarcation était tapissé d'une sorte de mousse, le mourant se mit à manger cette verdure pour apaiser la faim qui le tenaillait. Ayant suivi, bien malgré lui, ce régime végétarien pendant plusieurs jours, il vit son état s'améliorer puis la guérison survenir rapidement.

D'ailleurs BACHSTRÖM, lui aussi, place au premier rang des agents étiologiques le manque de végétaux frais :

« C'est, dit-il, la véritable cause de la maladie, et partout « où les individus, par négligence ou nécessité, ne peuvent « consommer de fruits ou de légumes verts, l'affection ne « tarde pas à apparaître, quels que soient le sol, le climat « ou l'âge des individus ». (2)

En 1756, le médecin anglais LIND publie un ouvrage très documenté contenant de nombreuses observations sur les marins atteints de scorbut. Tout en confirmant les remarques faites par les auteurs précédents, il établit d'une façon définitive, non seulement l'action curative du jus de citron, mais aussi son action préventive. On supposa que le citron devait ses propriétés antiscorbutiques aux acides organiques et à la potasse qu'il contient. Bientôt, l'usage de ce traitement se répandit et, dès 1757, l'emploi du « lime juice » fut rendu obligatoire sur les navires de la marine royale britannique.

Le capitaine COOK, lorsqu'il organisa, en 1775, son expédition au Pôle Sud, tint compte de ces diverses constatations. Il prit soin d'emmener avec lui une abondante provision d'oranges et de citrons: Grâce à ce moyen, il parvint à préserver tout son équipage de la terrible maladie.

Plus tard, en 1874, LEROY DE MÉRICOURT, médecin de la Marine, soutient la thèse de LIND devant l'Académie de Médecine. Bien que son argumentation fut étayée par de très nombreuses observations personnelles, il n'arriva pas

à convaincre tous ses contradicteurs. Beaucoup d'auteurs, en effet, continuaient à voir dans le scorbut une maladie contagieuse, et ils ne pouvaient admettre qu'une affection aussi redoutable pût se guérir par un remède aussi simple.

Enfin, il ne faut pas oublier, au cours de cet historique, de parler du scorbut infantile, affection à laquelle deux noms se trouvent liés. En 1856, un médecin allemand MOELLER, donne une description assez précise de cette forme de scorbut chez l'enfant. Toutefois, ayant constaté des lésions osseuses, il attribue à tort cette manifestation au rachitisme et désigne la maladie sous le nom de rachitisme aigü. C'est Thomas BARLOW qui, en 1894, sut découvrir le rapport qui existait entre cette affection qui atteint les tout jeunes enfants et le scorbut des adultes.

L'usage obligatoire du « lime juice » dans les marines et le développement du machinisme amenèrent peu à peu la disparition du scorbut. Néanmoins, lorsque dans certaines circonstances, des groupements d'individus se trouvent obligés de subir dès conditions de vie exceptionnelles, le scorbut ne tarde pas à faire sa réapparition. Un ravitaillement difficile ou une sous-alimentation prolongée entraîne facilement un régime carencé en végétaux frais qui provoque la maladie. La guerre avec son cortège de fléaux : destruction systématique des richesses d'un pays, blocus, accaparement des denrées au profit exclusif du vainqueur, nous en offre un vivant exemple.

Les cas furent nombreux en Amérique pendant le conflit qui opposa les Nordistes aux Sudistes. En France, pendant la guerre de 1870, Paris assiégé connut la famine et le scorbut. A Port-Arthur, durant la guerre russo-japonaise, presque la moitié de la garnison fut atteinte.

Les Boers prisonniers des Anglais au Transvaal furent décimés par le scorbut. Pendant la guerre de 1914, la maladie fit de nombreux ravages, et particulièrement sur le front oriental : les troupes serbes au cours de la retraite d'Albanie, les troupes italiennes en Macédoine, la garnison anglaise de Kut-el-Amara, etc... Enfin, la population civile qui eut à souffrir de la famine, en Russie et en Autriche, fut sévèrement touchée.

Toutefois, le scorbut typique de l'adulte, sous sa forme grave, se manifestait de plus en plus rarement. D'ailleurs, la thérapeutique par le citron ou les végétaux frais, pour

empirique qu'elle fût, n'en avait pas moins été adoptée un peu partout avec succès.

La diminution de fréquence du scorbut d'une part, les progrès de la Science d'autre part, devaient amener les chercheurs à s'orienter dans une autre voie.

Dès 1895, Théobald SMITH, au lieu de se baser sur des observations cliniques, eut l'idée de provoquer le scorbut chez un animal. Nourrissant des cobayes avec de l'eau et de l'avoine, il détermina chez ces animaux des symptômes hémorragiques en tous points semblables à ceux qu'on pouvait remarquer chez les malades atteints de scorbut. Théobald SMITH ouvrait ainsi l'ère des recherches expérimentales.

Plus tard, en 1907, HÖLST et FRÖHLICH, chargés par le Bureau d'Hygiène de Christiania d'une enquête sur l'alimentation des marins norvégiens, reprirent ces expériences. Travaillant sur des cobayes soumis à un régime scorbutigène (graines de céréales et eau), ils s'efforcèrent de déterminer les aliments capables de guérir ou de prévenir le scorbut. Ils en conclurent que le citron, l'orange, le chou, le pissenlit etc..., ainsi que les jus frais que l'on peut extraire de ces végétaux, contiennent une substance antiscorbutique, soluble dans l'eau et dans l'alcool, très instable et thermolabile. Ils remarquèrent, toutefois, que cette substance est beaucoup plus stable en présence d'acides organiques comme ceux qui existent dans le citron et l'orange, mais que ces acides organiques sont eux-mêmes dénués de tout pouvoir antiscorbutique.

En 1914, FUNK n'hésite pas à ranger le scorbut dans la catégorie des avitaminoses et à classer la substance antiscorbutique dans le groupe des Vitamines.

Certains expérimentateurs comme JACKSON, MOODY et MOORE, ayant observé que le lait frais (qui possède une certaine valeur antiscorbutique) n'était pas toujours capable de préserver le cobaye du scorbut, contestèrent le fait.

MORGEN et BEGER prétendaient que la maladie était dûe à une intoxication par acidose. MOURIQUAND et MICHEL démontrèrent ultérieurement l'erreur de cette hypothèse.

Mc. COLLUM et PITZ (1917), n'ayant pu déterminer le scorbut chez le rat, prétendirent qu'il ne pouvait s'agir d'une maladie par carence. En fait, il fut démontré plus tard que certaines espèces (dont le rat) ne sont pas caren-

çables en vitamine antiscorbutique. Cela explique l'insuccès des expériences de Mc. Collum et Pitz ainsi que les conclusions erronnées qu'ils en tirèrent alors.

En 1918, Pitz attribua le scorbut à un trouble du métabolisme des sels de calcium, mais comme la thérapeutique par les sels de calcium ne donnait aucun résultat, cette théorie fut abandonnée.

Finalement, les nombreuses expériences accomplies vinrent confirmer la théorie de Funk et démontrèrent d'une façon péremptoire l'existence d'une vitamine antiscorbutique qui fut appelée vitamine C par Drummond.

Restait à isoler définitivement cette vitamine antiscorbutique à l'état pur afin d'en faire une étude systématique.

Bezssoñoff en France et Zilva en Angleterre obtinrent, le premier à partir du jus de chou, le second à partir du jus de citron, des extraits fortement concentrés en vitamine C. Mais c'est surtout aux remarquables travaux de Szent-Györgyi (1930-1933) que sont dûs l'isolement et l'identification chimique de la vitamine C à l'acide l-ascorbique.

De nombreux travaux, et notamment ceux de Bezssonoff, Zilva, Hirst, Harris et Ray, von Euler, Tillmans, Randoin, confirmèrent la découverte du savant hongrois.

Enfin, en 1933, Reichstein, Grussner et Oppenhauer, puis Haworth, réalisèrent la synthèse de ce corps.

Actuellement, de nombreux laboratoires livrent au commerce cette précieuse vitamine C sous forme de comprimés ou d'ampoules. L'absence de végétaux frais jadis si redoutable, n'est donc plus à craindre aujourd'hui. Une fois encore, la lutte si longue de l'homme contre la maladie s'est terminée par la victoire de la Science.

CHAPITRE II

Constitution chimique

Isolement de la vitamine C

Comme nous venons de le voir dans un bref historique, c'est aux expériences de Hölst et Fröhlich (1907) (606) que remontent nos premières connaissances sur les propriétés de la vitamine antiscorbutique.

Agopian, le premier, s'efforça d'isoler la vitamine en la précipitant par des sels métalliques. De ses expériences, il avait conclu que le principe actif était composé d'une substance azotée lévogyre, d'un sucre réducteur et d'un acide organique.

Au cours de longs travaux effectués entre 1918 et 1926, Zilva (3) parvint à extraire des fruits de divers citrus et plus spécialement du citron, un produit très voisin de l'acide ascorbique, comme on a pu le reconnaître ultérieurement. Il obtenait ce résultat en éliminant tout d'abord les constituants inactifs, puis en précipant la vitamine sous forme de complexe par l'acétate de plomb.

De son côté, Bezssonoff (4) avait obtenu, à partir du jus de chou des extraits concentrés en principe antiscorbutique.

Mais les produits ainsi préparés étaient trop impurs pour servir à des recherches précises et systématiques.

Bezssonoff (5), toujours à partir du jus de chou frais, obtient des aiguilles cristallines incolores, très hygroscopiques, fondant à 47°, très oxydables, solubles dans l'eau, insolubles dans l'éther, le benzène et le toluène. Cette poudre, à la dose de 2 mgr. par jour, empêchait l'évolution du scorbut chez le cobaye. Poussant son étude, Bezssonoff établit la formule centésimale de ce corps. Il précise alors

que cette substance, très riche en vitamine C, est un composé ternaire, probablement un orthodiphénol. En fait, il devait par la suite identifier ce produit avec une forme combinée de l'acide ascorbique.

En 1924, ZILVA et CONNELL (6) confirment qu'il s'agit bien d'un composé ternaire, dépourvu d'azote, de grosseur moléculaire voisine de celle d'un hexose et doué de propriétés réductrices accentuées. On crut alors que le pouvoir antiscorbutique était fonction de ce pouvoir réducteur. Contrairement à cette hypothèse, l'expérimentation ne donna aucun résultat précis. Tantôt le produit, peu réducteur, était doué d'une action antiscorbutique puissante ; tantôt, au contraire, la propriété réductrice semblait être proportionnelle au pouvoir antiscorbutique. Ces faits amenèrent ZILVA (7) à penser que le principe réducteur qu'il avait retiré du citron n'était pas identique à la vitamine C.

C'est à TILLMANS (8) que revint le mérite d'expliquer ce phénomène. Il prétendit qu'il y avait bien identité entre le principe réducteur retiré du citron et la vitamine C à condition d'admettre que la vitamine pouvait subir une oxydation réversible sans perdre son activité antiscorbutique.

La théorie de TILLMANS devait être reconnue exacte par la suite, mais comme il arrive souvent dans le domaine scientifique, c'est d'une façon bien imprévue que fut isolée et identifiée la vitamine C.

Le savant hongrois SZENT-GYÖRGYI était convaincu que la respiration, dans les tissus végétaux et animaux, s'effectuait suivant des processus physico-chimiques identiques. Il pensait aussi que le cortex surrénal jouait un très grand rôle dans le mécanisme des oxydations biologiques. Partant de ces hypothèses, il se livrait depuis 1924 à une série de travaux ayant pour but d'étudier les systèmes d'oxydo-réduction chez les plantes et les animaux.

Au cours de ses recherches, il fit une remarque particulièrement importante sur les peroxydases (30).

Si l'on ajoute à une solution de peroxydase purifiée quelques gouttes de teinture de gaïac et quelques gouttes d'eau oxygénée diluée dans l'eau, il se produit une coloration bleue.

Mais si l'on effectue la même réaction sur du jus de raves qui contient des peroxydases, on constate qu'il n'ap-

paraît pas de coloration. Jusqu'alors, les chimistes pensaient que la réaction était inhibée par des substances indéterminées.

Cette explication lui paraissant insuffisante, SZENT-GYÖRYGI fit l'expérience suivante :

« Après avoir mélangé le jus de raves et la teinture de gaïac, il ajoute de l'eau oxygénée goutte à goutte. Tout d'abord, il ne se produit rien, mais si l'on continue à verser des gouttes d'eau oxygénée, on voit brusquement apparaître une coloration verte qui fonce peu à peu. »

Il en conclut que si les premières gouttes d'eau oxygénée n'ont pas oxydé le gaïac en présence de peroxydase, c'est que leur oxygène était accaparé par des substances réductrices (ou Reducing Factor) contenues dans le jus de raves. Il retrouva d'ailleurs ce facteur réducteur, toujours associé avec des peroxydases, dans de nombreux jus de fruits et de légumes.

Mais, d'autre part, SZENT-GYÖRGYI avait également remarqué que le nitrate d'argent était fortement réduit par le cortex surrénal.

En 1928, il réussit à isoler, à purifier et à analyser ce réducteur énergique à partir de la cortico-surrénale. Le corps ainsi obtenu semblait être un hydrate de carbone répondant à la formule brute $C_6 H_8 O_6$. Même dilué dans une grande quantité d'eau, il montrait une activité biologique appréciable et paraissait susceptible de jouer un rôle important dans les phénomènes d'oxydation cellulaire. En raison de sa parenté avec un hexose et de sa forte acidité, il fut appelé acide hexuronique.

Revenant alors aux tissus végétaux, SZENT-GYÖRGYI finit par extraire du jus d'orange et du jus de chou une substance absolument identique à l'acide hexuronique (9). Il se mit alors à préparer une certaine quantité de ce corps à partir du paprika, et une étude chimique détaillée de l'acide hexuronique fut entreprise par les laboratoires de chimie de l'Université de Birmingham.

Signalons en passant qu'en 1931, RYGH et LALAND (10) annoncèrent qu'ils avaient isolé la vitamine C du jus d'orange et qu'elle s'identifiait à la méthyl-nor-narcotine, produit résultant de la déméthylation des deux méthoxyles en ortho de la narcotine. Cette constatation semblait bien

concorder avec une hypothèse de Bezssonoff qui voyait dans la vitamine C un orthodiphénol (11).

Mais cette théorie fut rapidement reconnue fausse par ses auteurs et l'on ne s'intéressa plus désormais qu'à l'acide hexuronique.

Bientôt, Tillmans (8) déclara qu'il y avait identité entre l'acide hexuronique et la vitamine C. D'autre part, Waugh et King (12) isolèrent du jus de citron une substance cristallisée identique à l'acide hexuronique de Szent-Györgyi et doué d'une activité antiscorbutique très nette.

De leur côté, Svirbely et Szent-Györgyi (13) ainsi que Harris (14) établissent très nettement le pouvoir antiscorbutique de l'acide hexuronique.

Restait à savoir si le produit ainsi obtenu devait son activité antiscorbutique à l'acide hexuronique lui-même ou bien à une impureté.

Svirbely et Szent-Györgyi (15) montrèrent que le dérivé mono-acétonique de l'acide hexuronique était moins actif que l'acide lui-même, mais que si l'on régénérait l'acide hexuronique, celui-ci retrouvait sa pleine activité antiscorbutique.

Hirst et Zilva (16) prouvèrent également que l'oxydation primaire de l'acide hexuronique donnait un corps presque aussi actif que la substance mère et que cette dernière, régénérée par réduction, reprenait toute son activité.

L'hypothèse de Tillmans (8) se trouvait ainsi confirmée d'une manière indiscutable.

Enfin, la constatation que divers échantillons d'acide hexuronique préparés à partir de différentes sources naturelles ou obtenues synthétiquement à partir de produits inactifs, présentaient tous une même activité physiologique, permit d'identifier définitivement ce corps à la vitamine C. L'acide hexuronique prit alors le nom d'acide ascorbique (du grec α, privatif) ou vitamine C.

Structure de l'acide ascorbique

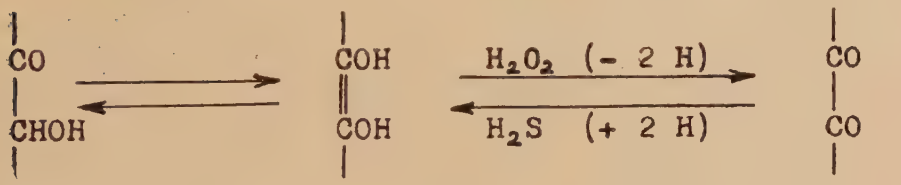
Szent-Györgyi ayant établi la formule moléculaire de l'acide ascorbique comme étant $C_6 H_8 O_6$, on entreprit d'étudier les diverses propriétés de ce corps afin d'en déterminer la structure.

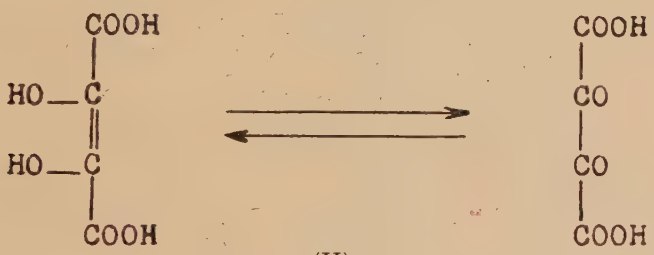
L'acide ascorbique est un acide monobasique donnant

des sels bien définis du type $C_6 H_7 O_6 M$. Il est doué d'un pouvoir réducteur puissant et son oxydation peut se faire progressivement par étapes. L'oxydation primaire correspond à la fixation d'un atome d'oxygène par molécule d'acide ascorbique. A ce stade, l'oxydation est réversible, et sous l'influence d'agents réducteurs comme l'hydrogène sulfuré ou l'acide iodhydrique, on peut facilement régénérer l'acide ascorbique. Mais si on oxyde par l'oxygène gazeux en présence de traces de cuivre comme catalyseur, la réaction dépasse le stade réversible et on aboutit à la destruction de la molécule.

On démontra ensuite la présence de quatre groupements hydroxyles dans la molécule. Deux de ces groupements

(I)





(II)

peuvent être méthylés par le diazo-méthane et, de ce fait, apparaissent comme ayant un caractère énolique [17] [18].

L'acide ascorbique réagit facilement sur la phénylhydrazine en donnant une osazone, ce qui indique la présence d'un groupement cétonique capable de subir l'énolisation [19].

Ceci nous est confirmé par l'examen du spectre d'absorption dans l'ultra-violet. On peut, en effet, constater la présence d'une bande intense pour 2450 Å en solution acide, ce qui est un fait général pour les composés énoliques.

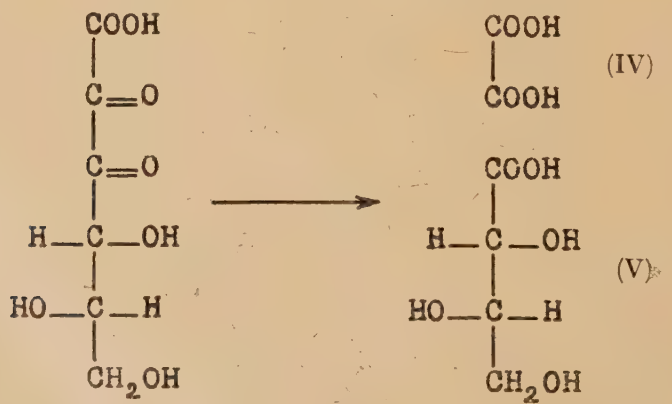
En outre, l'intensité de l'absorption permet de supposer l'existence de deux doubles soudures conjuguées dans la molécule.

Ces diverses propriétés nous conduisent à admettre que l'acide ascorbique contient le groupe (I). On ne peut manquer alors de remarquer l'analogie que présente ce groupe avec l'acide dihydroxymaléique (II) qui possède lui aussi une absorption analogue à celle de l'acide ascorbique et peut subir une oxydation réversible par l'iode en solution acide [20].

L'examen cristallographique et l'étude du spectre de l'acide ascorbique par les rayons X révélèrent un aplatissement exceptionnel de la molécule. Ce fait permit de faire une discrimination entre diverses formules structurales qui, au premier abord, avaient paru correspondre aux propriétés chimiques reconnues [21].

La constatation que l'acide ascorbique peut-être transformé presque quantitativement en furfurol fit penser à la présence, dans la molécule, d'une chaîne carbonée droite non ramifiée.

L'étude sur l'oxydation du produit d'oxydation primaire de l'acide ascorbique (III) au moyen de l'hypoiodite de sodium [22] vint confirmer cette supposition. En effet, par cette oxydation, on obtient la coupure de la molécule entre les deux groupements cétoniques et production avec un rendement presque quantitatif d'acide oxalique (IV) et d'acide l. thréonique (V).



(III) (IV) (V)

Ces faits montrent qu'en solution alcaline, le produit d'oxydation primaire de l'acide ascorbique se comporte comme le sel de l'acide (III), et qu'il se rattache à la série du l. glucose. Par conséquent, l'acide ascorbique doit lui aussi se rattacher stéréochimiquement au l. glucose.

En étudiant la formation de la substance (III), on s'aperçut que le produit primaire de l'oxydation réversible de l'acide ascorbique ne possédait pas de propriétés acides. Mais si l'on maintient la substance (III) en solution aqueuse, elle retrouve son acidité. Elle se comporte donc en tous points comme un lactone. On en conclut que le caractère acide de l'acide ascorbique lui-même n'était pas dû à un groupement carboxyle libre, mais qu'il devait être attribué à un hydroxyle énolique.

Ceci une fois démontré, il restait à préciser la nature exacte, en γ ou en δ de l'anneau lactonique.

Cette identification résulte de l'étude de l'oxydation du dérivé tétraméthylé de l'acide ascorbique par l'ozone [23]. Micheel et Kraft [18] avaient déjà obtenu un dérivé diméthylé par action du diazométhane sur l'acide ascorbique.

Ils avaient montré que cet acide diméthylascorbique pouvait donner un dérivé di-para-nitrobenzoylé, et que celui-ci, oxydé par l'ozone, produisait un ester neutre contenant le même nombre d'atomes de carbone que le produit non oxydé. Cela prouvait l'existence d'un système annulaire dans l'acide ascorbique.

Mais les produits obtenus par hydrolyse de l'ester neutre (acide oxalique et acide l thréonique) ne permettaient pas de déterminer la nature de l'anneau lactonique, d'autant plus qu'on admettait alors la présence d'un carboxyle libre dans la molécule d'acide ascorbique.

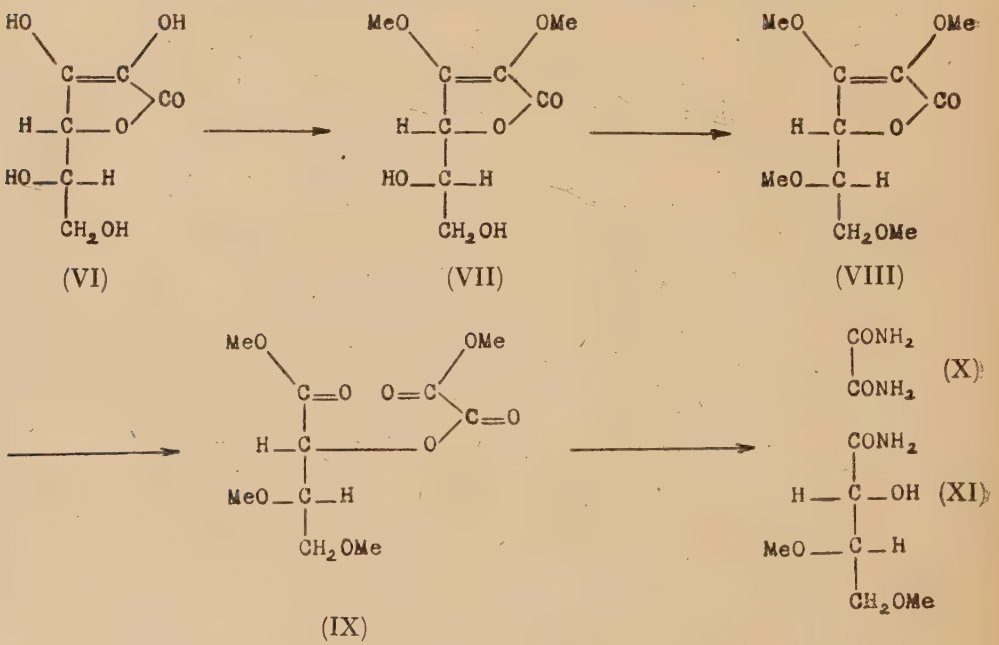
Par contre, si on traite le dérivé diméthylé (VII) par l'oxyde d'argent et l'iodure de méthyle, on obtient facilement l'acide tétraméthyl-l-ascorbique (VIII) [20] [23].

Si l'on traite ce dérivé tétraméthylé (VIII) par l'ozone, on obtient un ester neutre (IX). L'action de l'ammoniaque sur cet ester neutre donne naissance à deux amides : l'oxamide (X) et l'amide de l'acide 3-4 diméthyl-l-thréonique (XI).

On peut constater alors que cette dernière substance (XI) donne une réaction de Weerman fortement positive (formation de cyanate de sodium par action de l'hypochlorite de sodium sur l'amide). On en conlut que l'amide de l'acide

3-4 diméthyl-l-thréonique contient un groupement hydroxyle en position α. De ce fait, on peut déduire immédiatement que, dans les acides tétraméthyl-ascorbique, diméthyl - ascorbique et dans l'acide ascorbique lui - même, l'anneau lactonique est du type γ et qu'il se rapporte au groupement hydroxyle situé sur le quatrième carbone de la chaîne.

L'acide ascorbique sera donc représenté par la formule (VI). En effet, si l'acide ascorbique renfermait un anneau

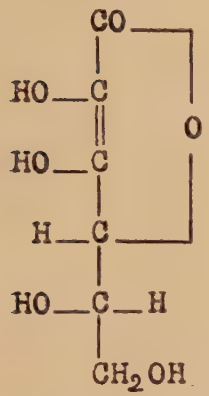


lactonique δ l'action de l'ammoniaque sur l'ester neutre provenant de l'ozonisation fournirait de l'oxamide et l'amide de l'acide 2-4 diméthyl-l-thréonique qui ne donnerait pas la réaction de WEERMANN.

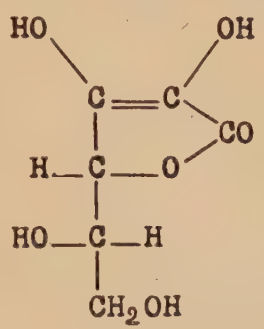
Ces constatations amenèrent HIRST et ses collaborateurs à proposer, dès 1933, une formule structurale (XII) qui fait de l'acide ascorbique la forme énolique de la 2-céto-l-gulonolactone. Par conséquent, l'acide l-ascorbique se rattache au cycle furanose.

Cette structure explique parfaitement les propriétés chimiques de l'acide ascorbique. D'ailleurs, si l'on construit

des modèles atomiques, on voit que les dimensions et la structure plate correspondent aux observations cristallographiques et à l'étude moléculaire par les rayons X.



Formule semi-développée



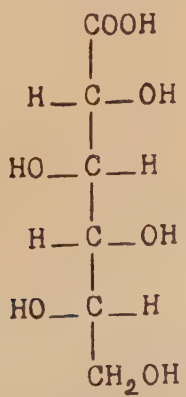
Formule développée (Hirst)

Acide — l — ascorbique

(XII)

De nombreux faits constatés avant et après l'établissement de cette formule viennent encore confirmer cette structure.

Ainsi, Micheel et Kraft [24] ont montré qu'en hydrogénant catalytiquement l'acide ascorbique, on obtient avec un très bon rendement de l'acide-l-idonique (XIII) ce qui est un excellent argument en faveur de la formule de Hirst.



(XIII)

D'autre part, on sait que CRIEGEE (25) avait montré, en 1932, que l'oxydation d'une fonction alcoolique primaire par le tétra-acétate de plomb produisait de l'aldéhyde formique si cette fonction se trouvait à côté d'un oxhydryle libre. KARRER (26) eut l'idée d'appliquer cette réaction à l'acide ascorbique. Il était, en effet, évident que l'acide ascorbique ne pourrait fournir de l'aldéhyde formique que s'il possédait un anneau lactonique γ (nature furanique). Néanmoins, en raison de la grande instabilité de la vitamine C, KARRER ne put obtenir d'aldéhyde formique. Mais, par contre, si l'on part, comme l'on fait MICHEEL et KRAFT (24) de l'acide diméthylascorbique, beaucoup plus stable, on obtient de l'aldéhyde formique. Ce fait indique donc la présence de deux groupement oxhydryles sur deux atomes de carbone contigüs (dans le cas présent C_3 et C_6) et confirme ainsi la nature furanique de la vitamine C.

Pour ces nombreuses raisons, la formule de HIRST qui rend un compte exact des diverses propriétés de l'acide ascorbique, fut bientôt adoptée définitivement. Cette formule simplifia l'étude des nombreux dérivés de la vitamine C en permettant d'élucider rapidement les problèmes structuraux qui se posèrent à cette occasion.

CHAPITRE III

Préparation

En raison des applications chaque jour plus nombreuses de la vitamine C en thérapeutique, on fabrique actuellement une assez grande quantité d'acide l-ascorbique dans les laboratoires spécialisés. Industriellement, la vitamine C se prépare soit par extraction à partir des sucs de certains végétaux, soit par synthèse.

EXTRACTION

Au cours des recherches qui furent effectuées pour isoler la vitamine antiscorbutique, plusieurs procédés d'extraction furent proposés. En fait, ils offraient beaucoup d'analogies. Nous exposerons brièvement ces diverses méthodes qui ne présentent guère qu'un intérêt historique, afin de pouvoir nous étendre davantage sur la technique d'extraction pratiquée dans l'industrie.

Méthode de Bezssonoff (5)

On traite 100 litres de jus de chou frais par 40 litres d'eau contenant 3.200 gr. d'acétate de plomb et 1.600 cc. d'acide acétique. Le filtrat acide est concentré au quart, puis alcalinisé par la soude jusqu'à pH 8,2. Le précipité qui se forme contient toute la vitamine C. En effet, l'acétate neutre de plomb n'entraîne pas la vitamine C, tandis que l'acétate basique la précipite quantitativement. Le précipité est alors dissout dans l'acide acétique à 8 %. La précipitation et la redissolution sont renouvelées deux fois de suite. La solu-

tion du dernier précipité est diluée, puis traitée par l'hydrogène sulfuré. On élimine le sulfure de plomb, puis on évapore le liquide dans le vide jusqu'à consistance pâteuse et on reprend par l'eau distillée. Après avoir répété quatre fois cette opération (évaporation et reprise par l'eau) on additionne la solution de 5 volumes d'alcool à 95°. On filtre. La vitamine C qui est alcoolosoluble reste dans le liquide. On concentre la solution alcoolique et on épuise le résidu par l'alcool absolu. On obtient ainsi un extrait alcoolique qui est repris par l'acétone absolue puis évaporé à sec. Le produit final est constitué par des aiguilles critallines incolores, très hygroscopiques et oxydables. Donnée au cobaye à la dose de 2 milligrammes par jour, cette substance le préserve du scorbut.

Méthode de Zilva [28] [29]

a) On traite le jus de citron par l'acétate basique de plomb qui précipite la vitamine C. On sépare le précipité par centrifugation et on le redissout dans l'acide acétique. On élimine le plomb en le précipitant par le sulfate de magnésium et on traite la solution par deux volumes d'alcool absolu. On filtre et on concentre la solution alcoolique qui renferme la totalité du principe actif.

b) On concentre au sixième de son volume le jus de citron fermenté, puis on l'additionne progressivement de dix volumes d'alcool absolu. On élimine le précipité et on concentre le filtrat pour le ramener au volume initial. On obtient ainsi un extrait alcoolique doué d'un pouvoir antiscorbutique.

c) On traite le jus de citron par un excès de chaux. On laisse reposer une heure, puis on filtre et on concentre le filtrat au 1/5 du volume primitif. On ajoute un volume d'alcool égal à la moitié du volume initial. On recueille le filtrat et on lave le précipité à l'alcool. On réunit les solutions alcooliques et on ramène au volume primitif par distillation.

d) On concentre au sixième de son volume le jus de citron débarrassé du sucre par fermentation et on l'additionne de dix volumes d'alcool absolu. On filtre et on élimine l'alcool par distillation. On traite alors le filtrat par l'acétate basique de plomb qui précipite la vitamine. On dissout le précipité dans l'acide acétique, on élimine le plomb par le

sulfate de magnésium et on ramène la solution au volume primitif.

e) On décitrate 1.500 cc. de jus de citron, on concentre à 600 cc. et on traite par l'acétate neutre de plomb (qui ne précipite pas la vitamine). On élimine le précipité par centrifugation et on traite le liquide par un excès d'acétate basique de plomb (qui précipite la vitamine). On recueille le précipité par centrifugation et on le dissout dans l'acide acétique. On traite la solution acide par le sulfate de magnésium pour éliminer le plomb, on additionne de deux volumes d'alcool absolu et on filtre. On chasse l'alcool par distillation et on obtient un liquide possédant des propriétés antiscorbutiques marquées bien qu'on puisse constater une perte sensible d'activité.

f) On traite le jus trouble obtenu après expression du rutabaga par l'acétate neutre de plomb jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité. On élimine le précipité par centrifugation. Comme dans la méthode précédente, l'excès de plomb est enlevé par le sulfate de magnésium et l'alcool. On filtre, on élimine l'alcool par distillation et on ramène au volume primitif. Le liquide se montre préventif à la dose de 5 cc. par jour.

g) On traite le jus de rutabaga par deux volumes d'alcool et on filtre. On élimine l'alcool du filtrat, on précipite la vitamine par l'acétate basique de plomb. On dissout le précipité dans l'acide acétique, on traite par le sulfate de magnésium et l'alcool pour éliminer le plomb. On filtre, on chasse l'alcool par distillation et on ramène au volume primitif. La solution obtenue est préventive à la dose de 3 cc. *pro die*.

Comme on le voit, ces divers procédés présentent beaucoup d'analogies. Ils sont basés sur les propriétés défécantes de l'alcool dans lequel la vitamine est soluble, de l'acétate neutre de plomb qui n'entraîne pas non plus la vitamine C, et de l'acétate basique de plomb qui, lui, la précipite quantitativement.

Ces méthodes peuvent donc se résumer ainsi : défécation du suc végétal par un ou plusieurs des réactifs précédents, élimination du défécant et, enfin, concentration de la solution contenant le facteur antiscorbutique.

Mais les produits ainsi obtenus, s'ils possèdent une action

préventive évidente, ne constituent cependant pas la vitamine C à l'état pur. On ne pouvait donc songer à utiliser ces procédés dans l'industrie.

Plus tard, en 1933, Svirbely, Banga et Szent-Györgyi, s'inspirant des expériences de Zilva et de Bezssonoff, arrivèrent à mettre au point des méthodes d'extraction susceptibles de fournir industriellement de l'acide ascorbique chimiquement pur.

Bien que les sucs de fruits acides renferment une quantité appréciable de vitamine C (un litre de jus de citron contient environ 0 gr. 30 d'acide ascorbique), il existe d'autres végétaux comme les feuilles d'iris, les feuilles de glaïeul et le paprika qui sont plus riches encore en facteur antiscorbutique.

De nombreuses variétés de Capsicum sont cultivés en Hongrie : C. Annuum (piment des jardins), C. Tétragonum (paprika), C. Grossum (piment doux), C. Nobilis (poivre noble), etc... Le type le plus petit et le plus sec (poivre noble) est utilisé à l'état sec et pulvérulent comme épice. Le type charnu (piment) est consommé à l'état frais. Ces diverses variétés sont très riches en vitamine C et peuvent se prêter indifféremment à la préparation de l'acide ascorbique. Dans l'ensemble, le poivre noble titre un peu plus que les variétés charnues, mais donne moins de jus.

Avant maturité, le fruit vert ne contient que peu de vitamine C. Le titre s'élève rapidement avec la maturation, alors que les fruits tournent d'abord au brun, puis au rouge. Dans le fruit brun, le titre a presque atteint sa valeur maxima. Quand le fruit rouge, mûr, commence à se ratatiner et à sécher, le titre tombe à nouveau. Quelques variétés ne deviennent pas rouges, mais tournent au jaune à maturité. Leur titre en acide ascorbique est également élevé. Pour la production de vitamine C, on rejette les tiges, noyaux et graines qui constituent environ 1/3 du poids total et on n'utilise que la pulpe émincée du fruit.

Méthode de Svirbely et Szent-Gyorgyi (30) (31)

On traite 50 kilogs de pulpe par 1.750 gr. d'acétate de baryum en solution aqueuse saturée à chaud et on comprime. La solution claire est additionnée d'acétate de plomb à 5 % et ensuite d'ammoniaque jusqu'à réaction alcaline au

bleu de bromothymol. L'acide ascorbique est ainsi précipité par l'acétate de plomb ammoniacal. On isole le précipité par centrifugation et on le reprend par de l'acide sulfurique à 25 % jusqu'à réaction légèrement acide au bleu de bromothymol. On centrifuge pour éliminer le sulfate de plomb. La solution est déféquée à nouveau par l'acétate de baryum, puis soumise à un second traitement plombique. Après élimination du plomb, la liqueur finalement obtenue est concentrée dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Des impuretés sont encore éliminées à l'aide de méthanol, d'acétone, etc... Les liqueurs réunies sont évaporées dans le vide et abandonnées à la cristallisation.

Le rendement est excellent puisque l'on obtient 6 gr. 50 d'acide ascorbique à partir de 10 litres de jus.

Méthode de Banga et Szent-Gyorgyi (32)

On traite 450 litres de pulpe par 22 kilogs d'acétate acide de plomb en solution, préparée en dissolvant à l'aide de la chaleur 1 kilog d'acétate de plomb par litre d'eau. On ajoute alors, sans cesser d'agiter, de l'ammoniaque en filet mince jusqu'à réaction légèrement alcaline au bleu de bromothymol. Le précipité est rapidement séparé par centrifugation. Quarante litres de jus rendent environ 5 kilogs de précipité plombique humide. Ce précipité ne contient qu'environ la moitié de l'acide ascorbique présent à l'origine dans le fruit. Il peut être conservé plusieurs jours sans perte de vitamine, si l'on a soin de le tenir à l'abri de l'air. Ce précipité est assez pratique pour le transport de la matière première brute. On met alors le précipité plombique en suspension dans le plus petit volume d'eau possible. On travaille la masse et on y ajoute de l'acide chlorhydrique fort jusqu'à virage rouge très léger au bleu de bromothymol. On élimine le chlorure de plomb par centrifugation et on le lave avec un peu d'eau. On réunit les liquides aqueux et on les concentre sous pression réduite jusqu'à obtention d'un liquide sirupeux ne contenant pas plus de 15 à 20 % d'eau. Il est absolument indispensable que cette concentration se fasse à basse température et assez rapidement. En chauffant, le jus tourne au brun, et une matière résineuse apparaît qui rendrait le travail ultérieur très difficile. A cet

effet, les auteurs utilisent un appareil spécial de distillation dans le vide, dans lequel le chauffage et la distillation ont lieu dans un tube en spirale. Le temps de chauffage de toutes les parties du liquide est limité au temps nécessaire pour que le liquide s'écoule dans cette spirale (1 à 2 minutes).

La concentration est effectuée en deux temps. Le contact avec le cuivre doit être évité pendant tout le cours de l'opération.

Le liquide résultant, sirupeux, brun clair, contient 10 % d'acide ascorbique calculé sur le poids sec du résidu. Sous cette forme, la vitamine est stable et elle peut être conservée dans un endroit frais pendant des semaines sans rien perdre de son activité.

On ajoute à ce liquide sirupeux un volume égal d'acétone anhydre et le mélange est fortement agité à la machine pendant 10 minutes. Il est essentiel que cette agitation soit très énergique car elle doit conduire à une bonne dispersion des éléments. On laisse alors reposer le mélange pendant 15 minutes et on enlève l'acétone. L'huile subsistante est agitée de nouveau avec un volume égal d'acétone. Généralement, après cette seconde agitation, la suspension ne se sépare pas et il est nécessaire d'effectuer une séparation par centrifugation. L'acétone est à nouveau éliminée et le résidu est encore traité deux fois par la même méthode. A la troisième et quatrième agitation, les éléments se séparent spontanément.

Les liquides d'acétone réunis contiennent la plus grande partie de la vitamine. Toutefois, le résidu épuisé par l'acétone contient encore environ 1/5 de la vitamine totale. On peut extraire une partie de celle-ci en agitant l'huile avec de l'éthanol à 96 %. On élimine l'éthanol par distillation, on épuise le résidu par l'acétone et on ajoute aux liquides d'acétone obtenus précédemment.

L'extrait acétonique (A) contient 25 % de vitamine calculée pour le poids sec. Pour son traitement ultérieur, trois procédés différents ont été appliqués avec un succès à peu près identique puisque, dans chaque cas, on obtient à l'état cristallisé un quart de la vitamine présente à l'origine dans la plante. Le procédé à l'acétone est le plus simple. Il donne de bons résultats si l'extrait à traiter possède une teneur en vitamine relativement élevée (25 % environ). Avec des

extraits plus faibles, le procédé à la soude donne de meilleurs résultats. Enfin, le procédé au plomb présente une technique plus délicate.

Procédé a l'acétone

L'extrait acétonique (A) est concentré sous pression réduite et à basse température jusqu'à un état de sirop collant qui est traité sur la machine à agiter avec de l'acétone sec. La plus grande partie de la vitamine passe dans l'acétone qui contient alors 30 à 40 % de vitamine calculée pour le poids sec.

Le résidu huileux est dissout dans un peu d'éthanol puis précipité à nouveau avec un excès d'acétone en utilisant la machine à agiter. Le second extrait acétonique est concentré, et l'huile résultante est traitée par l'acétone pur.

Les extraits acétoniques sont réunis et concentrés dans le vide jusqu'à volume réduit. On ajoute à cet extrait acétonique concentré 1 cc. d'alcool-n-butylique par gramme de vitamine présente. Le reste de l'acétone est distillé sous pression réduite. Il reste alors, dissoute dans l'alcool butylique sous forme de sirop poisseux, la vitamine qui commence bientôt à cristalliser en se refroidissant. La cristallisation est poursuivie pendant deux à trois jours à 0°.

Procédé a la soude

On ajoute à l'extrait acétonique (A) une solution aqueuse saturée froide de NaOH, par petites quantités, avec agitation mécanique très énergique. Le sel sodique de la vitamine se sépare sous forme d'un élément liquide brun foncé. L'addition de soude est continuée jusqu'à ce qu'un cc. de liquide surnageant ne nécessite plus que 0,6 cc. d'iode N/100 en solution acide, l'amidon étant employé comme indicateur. L'excès de soude doit être évité.

On extrait l'acétone par siphonnage et l'élément contenant la vitamine est contrôlé à la phénolphtaléine. S'il ne colore pas l'indicateur, on ajoute de la soude jusqu'à réaction alcaline. On ajoute alors au liquide un volume égal d'éthanol à 96 %, on agite le mélange, puis on le laisse se séparer. On rejette l'alcool et on agite de nouveau le résidu avec le

même solvant. L'éthanol n'entraîne que peu de vitamine.

On ajoute une nouvelle quantité d'alcool, puis de l'acide chlorhydrique fort en petites doses jusqu'à ce que le liquide commence à faire virer le bleu de bromothymol. La totalité de la soude est ainsi neutralisée. On ajoute alors de nouveau de l'alcool jusqu'à ce que l'on ait cinq parties d'alcool pour chaque partie d'acide chlorhydrique utilisée. Le liquide est abandonné pour la nuit à — 20° et le chlorure de sodium cristallise. Le jour suivant, les cristaux de chlorure de sodium sont séparés sur un filtre de Büchner et lavés à l'alcool.

Ce filtrat alcoolique est concentré sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse, puis on y ajoute de l'acétone en petites quantités. Les premières doses d'acétone se mélangent au liquide, mais l'excès produit un précipité huileux, épais, qui est agité à diverses reprises avec de l'acétone. Les extraits acétoniques sont réunis et on distille partiellement l'acétone sous pression réduite. On achève comme dans le procédé ci-dessus : on ajoute de l'alcool - n - butylique, on achève la distillation de l'acétone et on laisse cristalliser.

Procédé a l'acétate de plomb

De l'acétate de plomb est fondu et chauffé jusqu'à ébullition. A ce moment, on ajoute à chaque kilog d'acétate de plomb un litre d'alcool éthylique à 96 %. Cette solution chaude est ajoutée en filet mince à l'extrait acétonique (A) en brassant vigoureusement. La vitamine se sépare sous forme d'une masse résineuse. On ajoute de l'acétate de plomb jusqu'à ce que le titre du liquide ne tombe plus par addition ultérieure du réactif. Le titre final du liquide est d'environ 0,6 cc. d'iode N/100 par cc. Pour chaque litre d'extrait acétonique, on utilise 300 à 400 cc. de solution d'acétate de plomb.

Le précipité résineux est séparé puis décomposé dans un mortier par de l'acide chlorhydrique fort, l'acide étant ajouté en petites quantités, aussi vîte qu'il est consommé, jusqu'à ce que le liquide commence à rougir, d'une façon faible, mais durable, le bleu de bromothymol. Le chlorure de plomb est séparé par centrifugation et lavé avec un peu d'eau. Les extraits aqueux sont concentrés dans le vide jusqu'à former une huile qui est épuisée par l'acétone

comme précédemment et cristallisée à partir de l'alcool n-butylique.

Cristallisation. — Remarques diverses

Les cristaux d'acide ascorbique peuvent être séparés sur un filtre de Büchner, mais ce procédé est généralement très pénible en raison de la viscosité de la liqueur mère. Il est préférable de séparer les cristaux par centrifugation, puis de les mettre en suspension dans un petit volume d'acétone auquel on ajoute assez de méthanol pour éviter la formation d'un précipité (environ 8 pour 2). Cette suspension est filtrée sur un filtre de Büchner et lavée avec le même mélange méthanol-acétone. Les cristaux sont à nouveau mis en suspension et lavés à l'acétone auquel on ajoute la quantité nécessaire de méthanol. Dans les lavages ultérieurs, on aura besoin de moins d'alcool méthylique.

On a constaté que la liqueur mère de toute cristallisation contenait toujours 20 % de vitamine (calculés pour poids sec). Si la cristalisation est provoquée dans un liquide contenant 30 % de vitamine, un tiers seulement de la vitamine sortira en cristaux. D'un liquide contenant 40 % de vitamine, la moitié seulement d'acide ascorbique cristallisera. Il est recommandable de contrôler la teneur en vitamine et la pureté relative des liquides à chaque étape de la préparation.

La liqueur mère de la cristallisation peut être fractionnée une fois de plus en la concentrant jusqu'à consistance d'huile collante et en épuisant celle-ci par agitation avec l'acétone. Des résultats encore meilleurs sont obtenus en traitant la liqueur mère par la soude et en répétant tout le protocole décrit comme « Procédé à la soude ». Ce second fractionnement donne environ moitié autant de vitamine cristallisée que la première cristallisation. Des tentatives ultérieures faites pour recouvrer encore de la vitamine après la seconde cristallisation ont été infructueuses. La perte de vitamine dans les liqueurs mères est importante. Banga et Szent-Györgyi estiment que des améliorations sur ce point sont nécessaires et possibles.

Dans la forme cristallisée sèche, la vitamine est stable, même à la température de la chambre.

La recristallisation a été effectuée de la manière suivante :

on mélange du méthanol et du Dioxan dans la proportion de 4 pour 1. Par ébullition dans ce mélange, on prépare une solution saturée de vitamine. Pour chaque kilog de vitamine, il faut environ six litres de liquide. On concentre alors la solution sous pression réduite jusqu'à ce qu'une cristallisation et le tamponnement rendent toute concentration ultérieure difficile. La vitamine, jaune à l'origine, se sépare alors sous forme de cristaux incolores présentant le poids moléculaire correct. La suspension est abandonnée pour la nuit dans la glacière, puis filtrée sur filtre de Büchner. La liqueur mère est à nouveau concentrée, puis laissée à cristalliser.

Par cette technique, Banga et Szent-Györgyi ont pu préparer, rien qu'à leur laboratoire, trois kilogrammes d'acide ascorbique chimiquement pur.

Comme, d'une part, la vitamine ainsi obtenue est très pure, et que, d'autre part, le rendement est appréciable, cette méthode d'extraction est couramment employée, car c'est la seule qui, dans l'industrie, puisse encore concurrencer les procédés synthétiques.

SYNTHESES

Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes de synthèse de la vitamine C. On obtient par ces procédés de l'acide l ascorbique absolument identique par sa structure et son activité au produit naturel. Le fait mérite d'être retenu car, bien souvent, les synthèses fournissent des corps inactifs ou moins actifs que la substance isolée par extraction. Dès lors, il est facile de comprendre la prépondérance des méthodes synthétiques dans la préparation industrielle de la vitamine C.

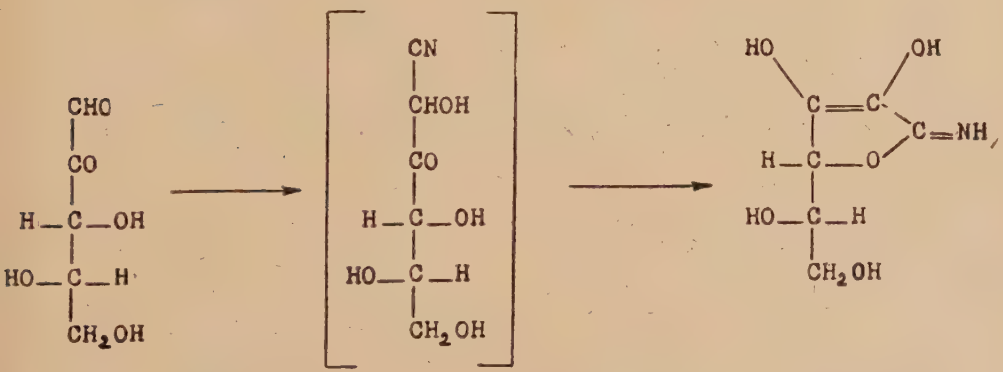
Méthode de Reichstein et d'Haworth

Simultanément, Reichstein et ses collaborateurs [33], d'une part, et Haworth et ses collaborateurs [34], d'autre part, réalisèrent en 1933 la synthèse de l'acide ascorbique. Cette méthode peut se résumer ainsi : addition de HCN à une osone suivie de l'hydrolyse acide du produit obtenu.

Ce principe peut évidemment s'appliquer aussi à la préparation de nombreux homologues ou isomères de l'acide ascorbique. Nous n'envisagerons toutefois que la synthèse de ce dernier.

SCHÉMA DE LA MÉTHODE

On part du l xylose dont on fait l'osazone, on décompose cette osazone par hydrolyse acide au moyen de l'acide chlorhydrique (HAWORTH) ou de l'aldéhyde benzoïque (REICHSTEIN) et l'on obtient la l xylosone (I). L'action de l'acide cyanhydrique sur la l xylosone donne un produit d'addition cristallisé $C_6\ H_9\ O_5\ N$, qui manifeste une forte bande d'absorption pour 2.750 Å. — Les propriétés de cette substance montrent qu'elle n'est pas la cyanhydrine à chaîne ouverte (II), mais le composé iminé cyclique (III) qui existe en solution aqueuse, à l'état de sel interne neutre, ce point étant prouvé par l'étude de la dispersion rotatoire de la substance en solution neutre ou acide (lorsque l'ionisation est supprimée).



(I) (II) (III)

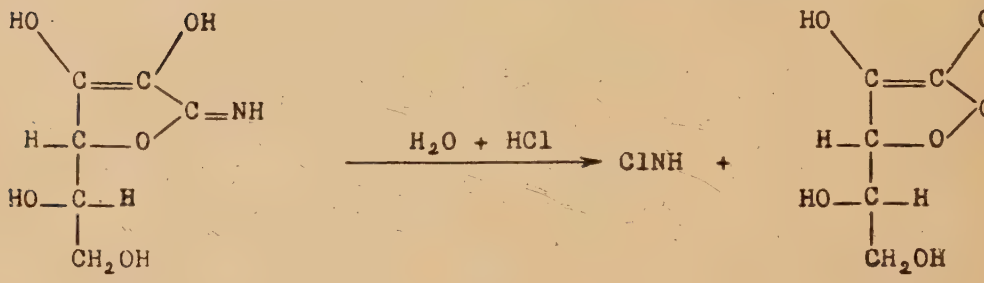
D'ailleurs, des formations cycliques du type (III) ont été obtenues au cours de la synthèse de composés analogues de l'acide ascorbique et la réaction semble être générale. Ce terme iminé intermédiaire présente une bande d'absorption intense dans l'ultra-violet, et il est oxydable par l'iode en solution acide, ce qui montre qu'il possède déjà plusieurs des propriétés caractéristiques de l'acide ascorbique.

Il suffit ensuite d'hydrolyser le composé iminé cyclique

(III) en le chauffant vers 50° avec de l'acide chlorhydrique à 8 % pour qu'il se transforme quantitativement en acide ascorbique (IV).

Dans sa première méthode, REICHSTEIN se servait d'acide cyanhydrique anhydre, tandis que HAWORTH employait le cyanure de potassium (35). Cette dernière opinion semble avoir prévalu puisque REICHSTEIN l'adopta à son tour.

Le point délicat de cette synthèse est l'obtention de la



(III) (IV)

l. xylosone, car le rendement est très faible. En effet, on obtient environ 14 % de xylosone à partir du xylose.

Notons enfin que cette synthèse peut être réalisée à partir du d. galactose (35) qui, par une série de transformations, peut conduire au l. xylosone comme l'indique le schéma suivant :

d. galactose ⟶ 1-2, 3-4 d. galactose diacétone ⟶ acide d. galacturonique 1-2, 3-4 diacétone ⟶ acide d. galacturonique ⟶ acide l. galactonique ⟶ l. galactonamide ⟶ l. lyxose ⟶ l. xylosazone ⟶ l. xylosone.

Parmi les nombreux composés analogues à l'acide l ascorbique qui ont pu être synthétisés par la méthode de REICHSTEIN et d'HAWORTH, nous signalerons l'acide d glucoascorbique, l'acide l glucoascorbique, l'acide d galactoascorbique, l'acide l araboascorbique, l'acide l guloascorbique, l'acide l alloascorbique, l'acide l rhamnoascorbique, l'acide d xyloascorbique (ou acide d ascorbique).

La nomenclature adoptée pour désigner ces composés fait dériver le nom de la substance de celui de l'osone utilisée dans la synthèse. On voit dans ces conditions que l'acide l ascorbique devrait se nommer acide l xyloascorbique.

TECHNIQUE DE LA MÉTHODE [33], [36]

a) Préparation de l xylosazone

On chauffe pendant trois heures au bain-marie le mélange suivant :

l xylose pur.....	20 gr.
Phénylhydrazine	60 gr.
Eau	350 gr.
Acide acétique cristallisable.....	40 gr.

On ajoute 100 à 150 cc. d'alcool pour dissoudre l'huile qui s'est séparée, puis on refroidit la solution par agitation. La l xylosazone brute cristallise. On la lave à l'eau, puis on la purifie en la traitant deux fois par du benzène à l'ébullition. Finalement, on fait cristalliser dans l'alcool à 40 %. La l xylosazone ainsi obtenue fond à 160°. Le rendement de cette opération est de 66,5 %.

b) Préparation de la l xylosone

Dans un ballon de quatre litres muni d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant ascendant et d'une soupape à mercure, on introduit le mélange suivant :

l xylosazone.....	20 gr.
Eau distillée chaude.....	2.000 cc.
Alcool	400 cc.
Aldéhyde benzoïque.....	32 cc.
Acide acétique cristallisable.....	20 cc.

On maintient à l'ébullition pendant une heure et demie en agitant fortement, puis on laisse refroidir tout en ayant soin de maintenir l'agitation. On lave à cinq reprises la solution avec de l'éther, puis on concentre dans le vide à un volume de 1.000 cc. et on décolore au moyen du noir animal. On évapore le filtrat jusqu'à siccité, on reprend le résidu par l'alcool absolu, on filtre et on évapore à sec. On achève la dessication en chauffant à 60° dans le vide pendant une demi-heure. Le rendement est faible : 22,3 %.

c) Obtention de l'acide l ascorbique

On prend :

Cyanure de potassium.....	3,6	gr.
l xylosone.....	6	gr.
Eau distillée purgée d'air.....	400	cc.

en opérant de la façon suivante : On dissout le cyanure de potassium dans une petite quantité d'eau et on ajoute cette solution à celle de l xylosone. On place ce mélange sous une atmosphère d'azote à une température de 15 à 20° et on le laisse ainsi pendant un quart d'heure.

On ajoute alors 6 cc. environ d'acide chlorhydrique concentré, de façon à obtenir l'acidité au Rouge Congo, puis on réduit dans le vide jusqu'à un volume d'environ 20 cc. Au moyen de 50 cc. d'eau saturée de gaz carbonique, on fait passer le résidu dans un petit ballon et on ajoute 10 cc. d'acide chlorhydrique concentré. On chasse l'air par le vide, on ferme soigneusement le ballon et on chauffe à 50° pendant quarante heures. On évapore dans le vide jusqu'à siccité en chauffant au bain-marie à une température inférieure à 40°.

On reprend le résidu par l'alcool absolu, on l'essore pour enlever les sels minéraux et on lave avec 80 cc. d'alcool absolu. On ajoute alors dix fois son volume d'éther récemment distillé et on laisse au repos pendant un certain temps. On filtre le liquide surnageant sur un filtre imbibé d'éther, on redissout le précipité dans 80 cc. d'alcool absolu, puis on le précipite à nouveau avec dix fois son volume d'éther. Cette précipitation par l'éther n'a lieu qu'en milieu acide. Le précipité doit être inactif sur la lumière polarisée, sinon il faut renouveler cette opération (redissolution et précipitation) une troisième fois. On jette alors le précipité. Par distillation on chasse l'éther. On laisse refroidir la solution alcoolique restante et on ajoute une solution alcoolique d'acétate de plomb, ce qui a pour effet de précipiter quantitativement l'acide ascorbique sous forme de complexe plombique. On centrifuge, on essore, on lave à l'alcool, on met le précipité en suspension dans de l'eau saturée de gaz carbonique et on élimine le plomb par un traitement à l'hydrogène sulfuré. On filtre, on lave le filtre avec de l'eau distillée, puis on évapore le filtrat au

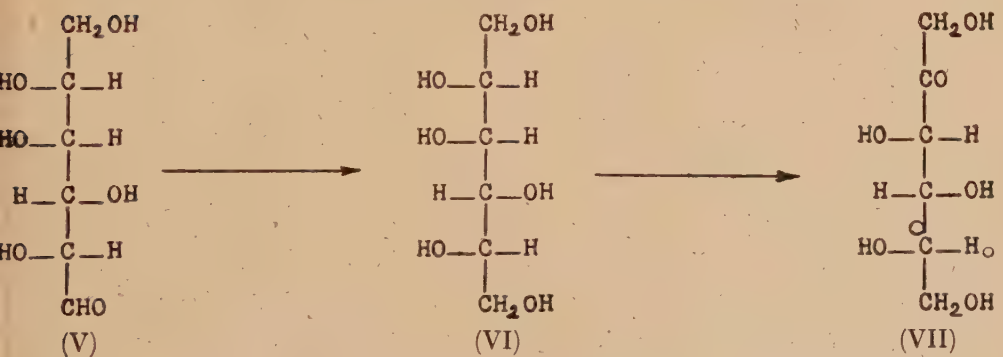
bain-marie à 40° jusqu'à consistance sirupeuse. Enfin, on fait cristalliser.

Si la méthode d'Haworth et Reichstein est intéressante parce qu'elle permet de réaliser la synthèse d'un grand nombre de composés analogues à l'acide ascorbique, il n'en reste pas moins que la préparation de la vitamine C, par ce procédé, n'offre qu'un rendement médiocre. Il est avantageux d'éviter le passage par la l xylosone, qui est si délicate à obtenir. Aussi l'application d'un autre mode de synthèse a-t-il permis de réaliser d'appréciables progrès dans la préparation industrielle de la vitamine C.

Méthode de Micheel, Reichstein et Haworth

SCHEMA DE LA METHODE

Par hydrogénation catalytique sous pression, on transforme le d glucose (V) en d sorbitol (VI). On oxyde le d sorbitol en l sorbose (VII) par action de la bactérie du sorbose (bacterium xylinum) (37).



Il faut ensuite oxyder le l sorbose pour le transformer en acide 2 céto l gulonique.

I. — Obtention de l'acide ceto 2 l gulonique

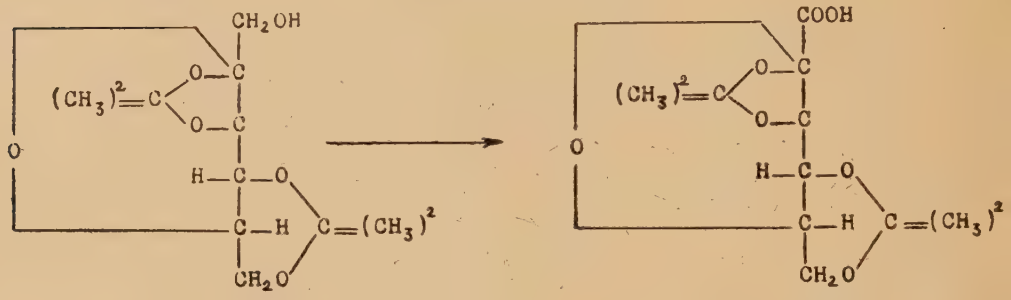
Deux procédés peuvent être utilisés pour cela.

a) Procédé de Micheel et Reichstein

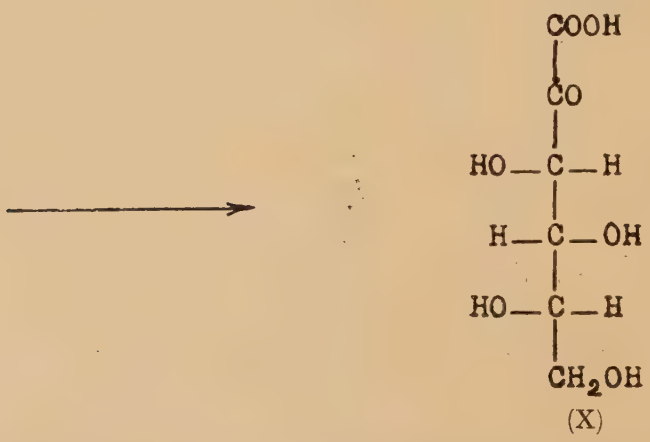
On bloque les oxhydryles du l sorbose en formant la l sorbose diacétone (VIII). Au lieu de condenser le sorbose

avec l'acétone, on peut employer aussi, comme l'a montré Reichstein (38), (39), (40), d'autres substances carbonylées comme l'aldéhyde benzoïque, l'aldéhyde formique, la cyclohexanone ou la méthylcétone.

On oxyde ensuite par le permanganate de potassium et l'on obtient l'acide diacétone céto 2 l gulonique (IX). Par enlèvement des restes cétoniques on libère l'acide céto 2 l gulonique (X) que l'on fait cristalliser.



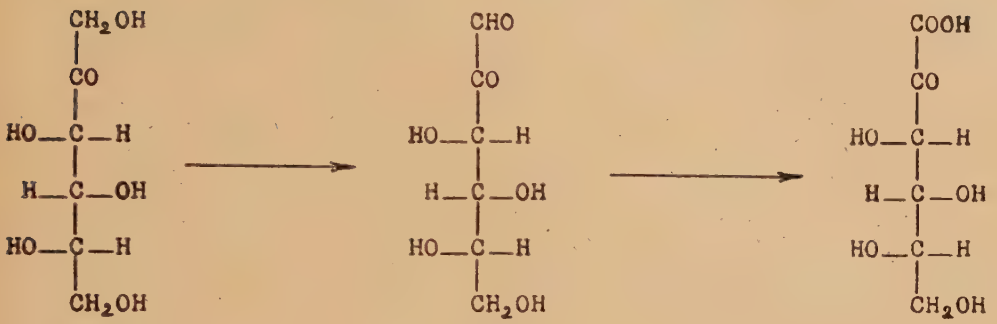
(VIII) (IX)



(X)

Remarque. — A titre documentaire, nous signalerons que, dans sa méthode initiale, Micheel (41), (42), tout en partant du sorbose, avait obtenu l'acide céto 2 l gulonique par un processus assez différent que nous résumerons brièvement. On fait la phénylosazone du l sorbose, puis en décomposant cette dernière par l'aldéhyde benzoïque on obtient la l sorbosone (XI). L'oxydation de la l sorbosone conduit à l'acide céto 2 l gulonique (acide sorburonique). Toutefois,

ce procédé, en raison de la difficile obtention de la l sorbosone, n'a pas été retenu.



(VII) (XI) (X)

b) *Procédé de Haworth*

Haworth et ses collaborateurs [43] ont signalé une méthode encore plus simple qui consiste à obtenir l'acide céto 2 l gulonique par oxydation directe du l sorbose. Haworth réalise cette oxydation au moyen de l'acide nitrique aqueux. Hoffmann-La Roche [44] emploie l'eau oxygénée en présence de catalyseurs, ou d'autres oxydants comme le permanganate de potassium ou le persulfate de potassium.

II. — Obtention de l'acide l ascorbique

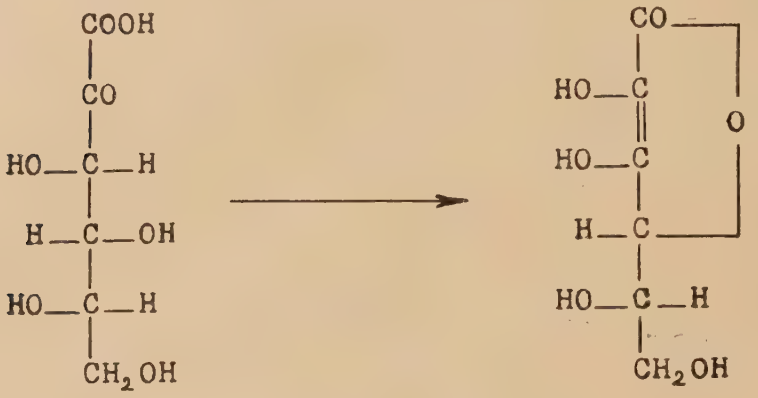
A partir de l'acide céto 2 l gulonique, obtenu suivant les méthodes précédentes, il est facile d'arriver à l'acide ascorbique. Là encore, plusieurs moyens nous sont offerts pour atteindre le terme de la synthèse.

a) En portant l'acide céto 2 l gulonique à une température de 100° dans une atmosphère inerte et en présence d'acide chlorhydrique dilué (ou d'eau saturée de gaz carbonique), on obtient sa transformation en acide ascorbique (XII), [38], [39], [40].

b) On alcalinise directement l'acide céto 2 l gulonique par la soude et l'on obtient le sel de sodium de sa forme diénolique (XIII) qui, sous l'influence d'un acide, s'isomérise en acide l ascorbique [41], [42].

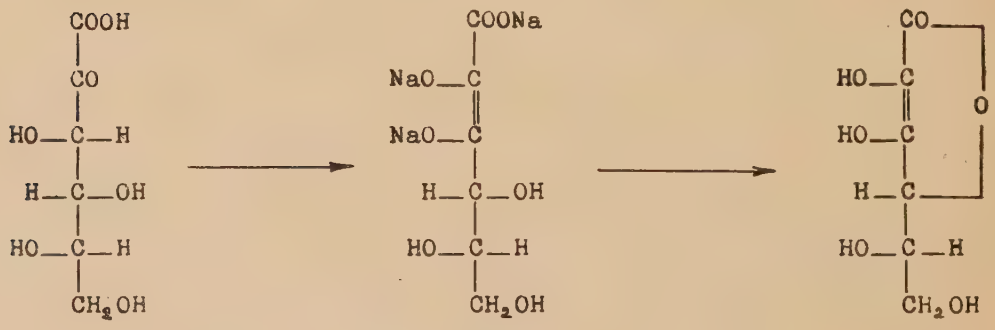
c) On fait l'ester méthylique de l'acide céto 2 l gulonique.

Cet ester méthylique (XIV) subit très facilement la cyclisation et l'isomérisation sous l'influence du méthylate de sodium et l'on obtient l'acide l ascorbique (38).



(X) (XII)

On obtient cet ester méthylique en dissolvant le sel de sodium de l'acide céto 2 l gulonique dans le méthanol absolu. On refroidit cette solution à — 15° et on y fait passer un



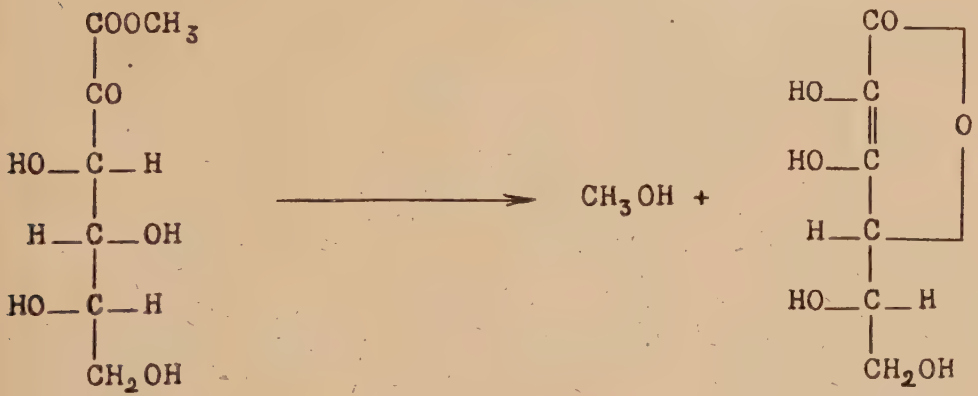
(X) (XIII) (XII)

courant d'acide chlorhydrique sec en excès. On ajoute alors rapidement une solution éthérée de diazométhane refroidie à — 15° jusqu'à obtention d'une coloration jaune persistante.

La transformation de l'ester méthylique en acide l ascorbique s'opère de la manière suivante : on dissout 15,5 gr. d'ester méthylique dans 150 cc. de méthanol absolu, puis on ajoute une solution de 1,70 gr. de sodium dans 20 gr. de

méthanol. On opère sous une atmosphère d'azote. On porte à l'ébullition durant une minute puis on refroidit et on ajoute du méthanol contenant 2,85 gr. d'acide chlorhydrique gazeux. On évapore à sec dans le vide et l'on fait recristalliser.

On peut aussi obtenir l'acide ascorbique en procédant ainsi : on dissout 200 parties de l'ester méthylique dans 2.000 parties d'eau et on ajoute environ 200 parties de carbonate de calcium pur. On chauffe à 80° dans un léger courant de gaz carbonique pendant deux heures. On rejette le carbonate de calcium non dissout en le filtrant sous une atmosphère de CO_2. On précipite le calcium par une quantité corres-



(XIV) (XII)

pondante d'acide oxalique. On élimine l'oxalate de calcium. On évapore à sec dans le vide et on fait recristalliser.

Le rendement de ces deux procédés est très bon : 75 à 80 %.

On pourrait utiliser également l'acétate de sodium dans le méthanol absolu, de même que le bicarbonate de sodium dans le méthanol ou l'éthanol absolu.

d) D'autre part, Elger [45] a montré que l'on pouvait facilement transformer l'acide diacétone céto 2 l gulonique en acide l ascorbique par action d'un mélange de chloroforme et d'alcool chlorhydrique.

Enfin, Wenner [46] obtient de l'acide ascorbique en faisant bouillir pendant vingt minutes l'ester allylique de l'acide diacétone céto 2 l gulonique avec de l'acide sulfurique à 20 %, et cela avec un rendement appréciable (75 %).

TECHNIQUE DE LA METHODE DE MICHEEL ET REICHSTEIN (38)

a) Préparation de la l sorbose diacétone.

On agite mécaniquement pendant vingt heures le mélange suivant :

Sorbose finement pulvérisé.....	100 gr.
Acide sulfurique concentré.....	80 cc.
Acétone	2.000 cc.

On refroidit alors la solution et on la neutralise en l'agitant durant cinq heures avec 300 gr. de carbonate de potassium pulvérisé. On filtre, on chasse l'acétone et on reprend le résidu par l'éther. En agitant le liquide avec une solution de potasse à 20 %, on extrait le dérivé monoacétonique. On sèche la l sorbose monoacétone sur du sulfate de sodium, on chasse l'éther et on distille dans le vide ($E_{0,}$: 135° environ). On complète l'acétonylation de la l sorbose monoacétone en la dissolvant dans 900 cc. d'acétone additionnée de 100 gr. de sulfate de cuivre anhydre et en l'agitant pendant plusieurs jours.

b) Préparation de l'acide diacétone céto 2 l gulonique.

On prend :

l Sorbose diacétone.....	100 gr.
Potasse	45 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

en opérant de la façon suivante : on dissout la potasse dans l'eau et on ajoute lentement la l sorbose diacétone. On refroidit la solution à 20° en l'agitant dans un courant d'eau tout en versant, dans l'espace d'une heure, une solution contenant :

Permanganate de potassium.....	86 gr.
Eau distillée	2.000 cc.

On continue d'agiter jusqu'à complète décoloration (trois à quatre heures), et on chauffe à 50° pour achever l'opération. On filtre pour éliminer l'oxyde de manganèse, on lave à l'eau chaude et on traite le filtrat avec un peu de gaz carbonique. Tandis qu'on refroidit le filtrat en l'agitant, on y ajoute de l'acide sulfurique en quantité telle qu'il soit acide

à la phtaléine mais encore alcalin au tournesol. On évapore dans le vide jusqu'à siccité, puis en épuisant par l'éther on arrive à extraire 18 gr. de l sorbose diacétone.

Le résidu contient le sel impur de l'acide diacétone céto 2 l gulonique. On le purifie par extraction au moyen de l'alcool absolu bouillant. On concentre l'alcool et on laisse le sel cristalliser. Pour obtenir l'acide libre, on dissout 100 gr. de ce sel purifié dans 200 cc. d'eau additionnée de 50 gr. de glace pilée. On agite très énergiquement et on ajoute le mélange suivant :

Acide chlorhydrique concentré.....	50 gr.
Glace pilée	50 gr.
Eau	50 cc.

L'acide diacétone céto 2 l gulonique libre précipite sous forme d'hydrate. On essore et on lave à l'eau glacée. Le point de fusion de cet hydrate est 98°-99°.

c) Préparation de l'acide céto 2 l gulonique.

On fait dissoudre 85 gr. de l'hydrate de l'acide diacétone céto 2 l gulonique dans dix fois son poids d'eau. On porte à l'ébullition et on maintient au bain-marie bouillant jusqu'à hydrolyse complète de l'acétone. Cette hydrolyse s'effectue en 48 minutes environ, et il est nécessaire de ne pas chauffer plus longuement, car le rendement serait diminué. On concentre dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Par refroidissement, l'acide céto 2 l gulonique cristallise. On le purifie en le lavant et l'essorant par l'acétone. Le rendement de l'opération est de 82 %. Le point de fusion de l'acide céto 2 l gulonique est de 171°.

d) Obtention de l'acide l ascorbique.

On chauffe pendant deux heures à 100° et dans une atmosphère d'azote ou de gaz carbonique le mélange suivant :

Acide céto 2 l gulonique.....	10 gr.
Eau saturée de gaz carbonique.....	50 cc.

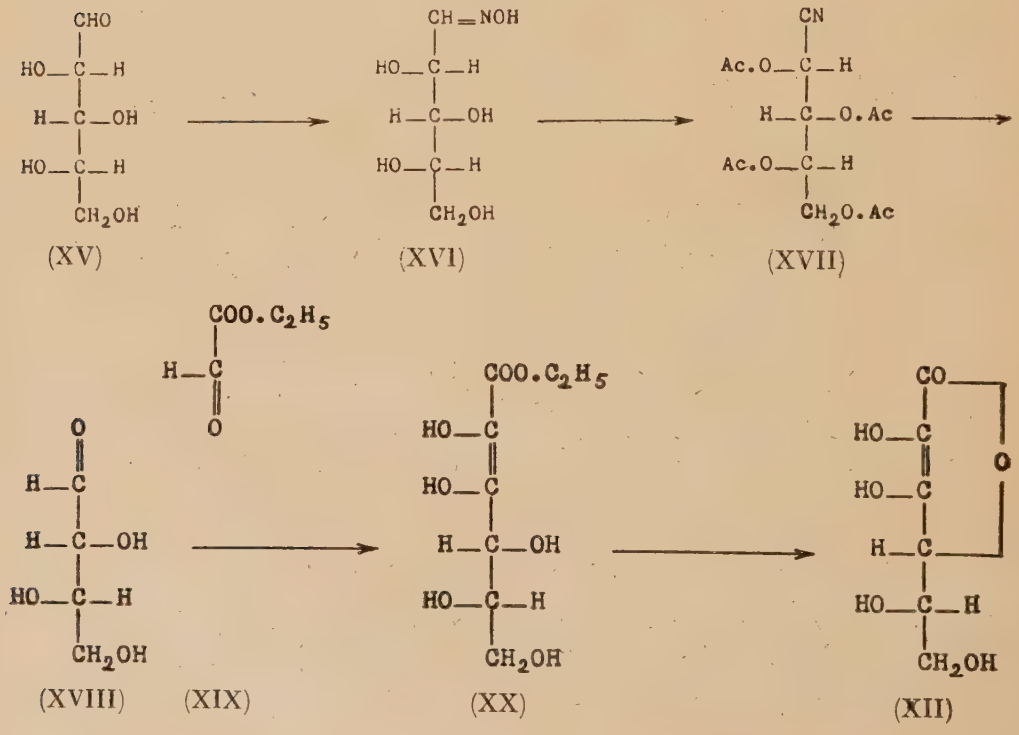
On concentre la solution dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. Par refroidissement, l'acide ascorbique cristallise. On le délaye alors dans l'acétone et on essore aussitôt, ce

qui a pour effet d'éliminer la majeure partie de l'acide céto 2 l gulonique non transformé. Si cette fraction se montre active vis-à-vis de l'iode en milieu acide, on la fait recristalliser dans une demi-partie d'eau et l'on réunit les eaux-mères aux eaux de la précédente cristallisation. On les concentre dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse, on ajoute quelque cristaux d'acide ascorbique et, après recristallisation, on délaye les cristaux dans l'acétone et on essore.

Méthode d'Helferich et Peters

En 1937, Helferich et Peters [47] réalisèrent une synthèse originale de la vitamine C. Le schéma en est très simple :

On condense le l thréose (XVIII) avec le glyoxalate d'éthyle (XIX). On obtient un composé d'addition du type acyloïne (XX). Sous l'action de l'acide chlorhydrique en milieu alcoolique, ce composé (XX) fournit de l'acide ascorbique (XII) avec libération d'éthanol.



Dans la pratique, on part du l xylose (XV) dont on fait l'oxime (XVI). Cette oxime déshydratée par l'anhydride acétique et l'acétate de sodium fournit un nitrile tétra-acétylé (XVII). Par l'action du nitrate d'argent ammoniacal, on enlève une molécule d'acide cyanhydrique et on saponifie les groupements acétylés. On aboutit ainsi au l thréose (XVIII) que l'on transforme en acide ascorbique par le processus que nous venons d'indiquer.

La synthèse d'HELFERICH et PETERS donne d'excellents rendements.

Toutes les méthodes que nous venons d'examiner conduisent à l'acide ascorbique synthétique, produit absolument identique, par sa structure et son activité, à l'acide ascorbique obtenu par extraction. Ce fait explique la faveur dont jouissent les procédés synthétiques dans la préparation industrielle de la vitamine C.

Notons enfin que ces diverses synthèses ont pu servir à préparer très facilement les dérivés analogues à l'acide ascorbique et ont permis ainsi d'établir clairement les rapports qui existent entre la structure de ces corps et leur activité antiscorbutique. Ce point, particulièrement intéressant, sera d'ailleurs étudié plus loin.

CHAPITRE IV

Propriétés physiques et chimiques

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

L'acide l ascorbique est une poudre blanche cristallisée en plaques rectangulaires fortement bi-réfringentes, de saveur acide. Cox et Goodwin [48] donnent les constantes physiques suivantes : cristaux monocliniques avec un aspect pseudo-orthorhombique : D = 1,74, n α = 1,476, n β = 1,594, n γ = 1,750. Le point de fusion non corrigé est de 192°. La formule brute $C_6 H_8 O_6$ donne un poids moléculaire de 176.

L'acide ascorbique est très soluble dans l'eau (vitamine hydrosoluble), dans le méthanol (solvant de choix) et un peu moins dans l'éthanol et l'acétone. Il est insoluble dans les huiles et leurs solvants, l'éther, l'éther de pétrole, le benzène et le chloroforme. Il précipite de ses solutions alcooliques par l'éther de pétrole et non par l'éther.

Il est dextrogyre, et son pouvoir rotatoire varie entre + 20° et + 22° suivant la concentration,

En solution aqueuse à 14 gr. % $(\alpha)_D^2 = + 20°$
— — 2,2 gr. % $(\alpha)_D^{20} = + 22°,4$
En solution alcoolique à 14 gr. % $(\alpha)_D^{20} = + 48°$

Il ne présente pas le phénomène de mutarotation. Karrer [49] a montré que le pouvoir rotatoire spécifique de son sel de sodium variait entre + 102° et + 105°.

A propos du pouvoir rotatoire, nous remarquerons que l'acide ascorbique naturel, et aussi celui que l'on prépare synthétiquement, s'appelle acide l ascorbique, bien qu'il dévie à droite le plan de la lumière polarisée. Cette anomalie apparente s'explique par la confusion partielle qui existe entre l'ancienne nomenclature et la nouvelle concep-

tion qui établit que les sucres (l) sont ceux qui dérivent de l'aldéhyde glycérique *gauche* par applications successives de la synthèse des cyanhydrines, *quel que soit leur pouvoir rotatoire propre.*

Son spectre d'absorption [50] est caractérisé par une bande unique intense ayant son maximum pour

λ = 2.450 Å en solution légèrement acide (ClH $^{N}/_{100}$).

λ = 2.650 Å en solution aqueuse.

λ = 3.000 Å en solution alcaline (NaOH $^{N}/_{10}$).

Le coefficient d'extinction moléculaire [20], [21], [51] pour une solution contenant 20 milligrammes par litre est de 10.000.

L'indice de réfraction [52], [53] pour la raie D du sodium est de

$$n\,\alpha = 1{,}47 \pm 0{,}005 \qquad n\,\beta = 1{,}68 \pm 0{,}005$$

L'acide ascorbique n'est pas adsorbable par la terre à foulon, les hydrates de fer (qui retiennent la vitamine B), mais il est adsorbé par le charbon de bois et les bougies poreuses.

Le potentiel d'oxydo-réduction de l'acide ascorbique est difficile à déterminer en raison de l'existence de diverses formes d'oxydation et surtout en raison de l'instabilité des formes oxydées en milieu neutre ou alcalin.

D'après Karrer [54] et Laki [55], l'acide ascorbique et sa forme oxydée ne constituent pas un système réversible et, par conséquent, on ne peut pas lui attribuer un potentiel normal d'oxydo-réduction. Le potentiel de ces solutions dépendrait uniquement de la forme réduite.

Cependant, Wurmser et de Loureiro [56], opérant à pH 1, ont pu déterminer le potentiel normal d'oxydo-réduction. Pour ces auteurs, l'acide ascorbique formerait un système complexe qui se trouverait en équilibre, non pas avec un, mais avec plusieurs produits d'oxydation reversible. Ces derniers aboutiraient peu à peu vers un produit d'oxydation définitive. Par extra-polation, Wursmer et de Loureiro ont pu calculer son potentiel normal d'oxydo-réduction à pH 7 (35°5 C). Il correspond à :

$$E_0 = + 0{,}066 \text{ volts (rH 16,2)}$$

Borsook et ses collaborateurs [57] confirmèrent ces données.

Martini [58] a montré que l'exposition de la solution d'acide ascorbique à la lumière diminuait son potentiel d'oxydo-réduction, surtout si l'on opère en présence d'éosine ou de bleu de méthylène.

Donc, le potentiel d'oxydo-réduction de l'acide ascorbique est très sensible à de nombreux facteurs. De toutes façons, s'il est exposé à l'action d'un corps d'un rH plus élevé, comme le dichlorophénol indophénol, son oxydation comparée à celles d'autres réducteurs est extrêmement rapide [59].

Ce potentiel d'oxydo-réduction explique certaines propriétés physiologiques de l'acide ascorbique et nous renseigne sur le mécanisme intime de l'action vitaminique sans toutefois permettre de l'élucider complètement.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Caractère acide

Birch et Harris [60], au moyen d'une microméthode utilisant 0,10 cc. de solution contenant 10 mgr. d'acide ascorbique, ont pu établir sa courbe de titration et montrer qu'il se comporte comme un diacide monobasique. Les constantes de dissociation obtenues sont

$$pK_1 = 4{,}17 \qquad \text{et } pK_2 = 11{,}57$$

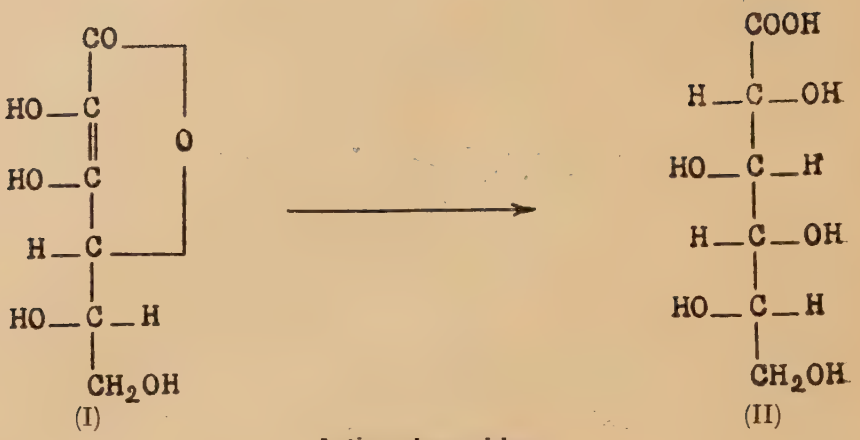
Donc, pK_1 est de l'ordre de grandeur d'un acide carboxylique α substitué, tandis que pK_2 peut être comparé au pH 10,7 trouvé pour le groupe céto-énolique du fructose et de l'acide acétylacétique.

La neutralisation par la soude donnera donc un dérivé monosodé (ascorbate de soude). L'acide ascorbique donne des sels bien définis du type $C_6 H_7 O_6 M$.

Le pH d'une solution aqueuse à 3 % d'acide ascorbique est de 2,2.

Action de l'hydrogène

L'hydrogénation catalytique de l'acide ascorbique [61] fournit de l'acide l idonique (II) isomère de l'acide gluconique.



(I) (II)

Action des acides

Si l'on chauffe de l'acide ascorbique avec de l'acide chlorhydrique, on obtient quantitativement du furfurol (19).

Action des cétones

En présence de sulfate de cuivre anhydre ou d'acide sulfurique à 8 %, l'acide ascorbique se condense avec les cétones. Les composés ainsi obtenus sont facilement hydrolysés par l'eau (62).

Action de l'ortho-phénylène-diamine

L'ortho-phénylène-diamine donne avec l'acide ascorbique un corps cristallisé en aiguilles jaunes fondant à 177°, dextrogyre.

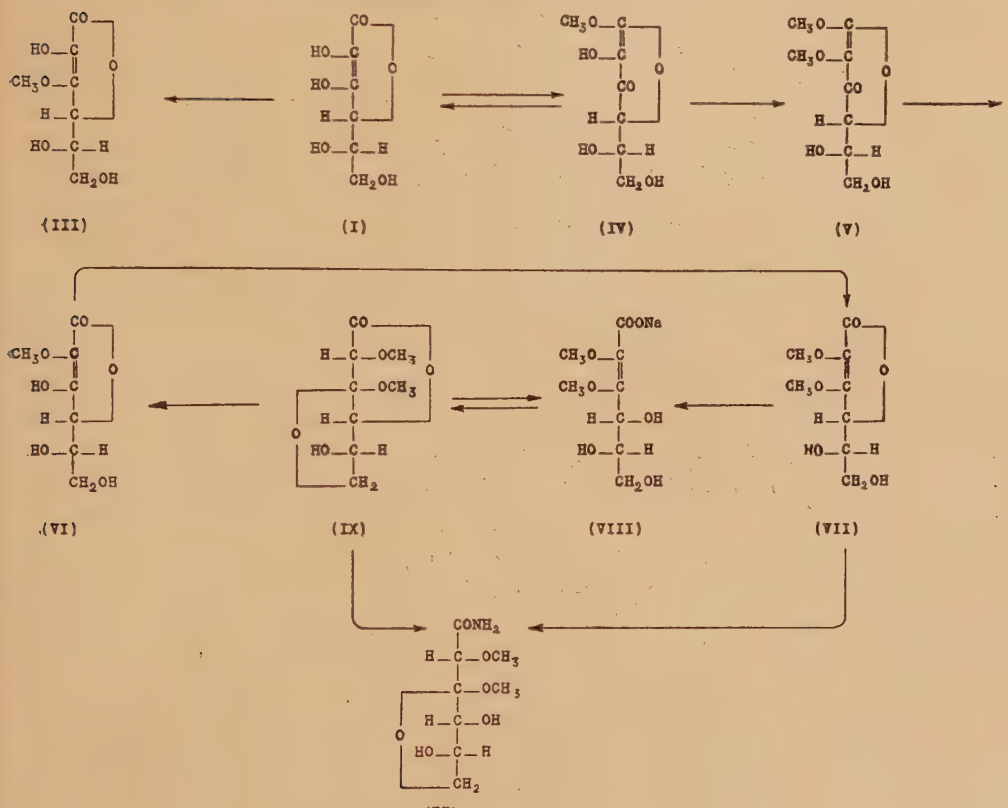
$$(\alpha)\ {}^{19}_{D} = 86°8\ (\text{ClH n})\ (63).$$

Action du diazométhane

L'action du diazométhane sur l'acide ascorbique est particulièrement intéressante, car elle soulève des problèmes un peu inattendus (64), (65).

L'un des hydroxyles énoliques est beaucoup plus réactif que l'autre, à tel point que l'on peut titrer l'acide ascorbique au moyen du diazométhane, car le produit qui en résulte possède la composition d'un dérivé monométhylé. Toutefois,

ce produit est un mélange du dérivé 3 méthylé (III) de structure normale et d'un dérivé 1 méthylé (IV) de l'une des nombreuses modifications tautomériques possibles de l'acide ascorbique. Ce dérivé (IV) peut être méthylé sans que sa structure soit modifiée et donner le dérivé 1 - 2 - diméthylé (V). Ce dernier, maintenu en solution aqueuse, perd l'un



de ses groupements méthylés. Le composé hydroxylé qui en résulte subit un réarrangement et l'on obtient finalement l'acide 2 méthyl ascorbique (VI) de structure normale. La méthylation de ce corps par le diazométhane conduit à l'acide 2 - 3 diméthylascorbique (VII) de structure normale. Remarquons d'ailleurs que la méthylation de l'acide 3 méthylascorbique (III) permet, elle aussi, d'obtenir l'acide 2-3 diméthylascorbique (VII) avec un rendement quantitatif.

En présence d'alcali, l'acide 2 - 3 diméthylascorbique se comporte comme une lactone ordinaire et il y a ouverture de la chaîne avec formation d'un sel de l'acide correspondant (VIII). Il y a donc là une différence évidente avec l'acide ascorbique non substitué qui donne des sels par l'intermédiaire de l'un de ses hydroxyles (vraisemblablement celui en C_3) et dont l'anneau lactonique ne s'ouvre pas, même sous l'influence de l'alcali concentré.

En tout cas, si l'on acidifie le sel (VIII), on constate alors que l'acide ainsi libéré possède des propriétés assez particulières. Le groupement carboxyle se lactonise de la manière habituelle, mais l'on observe également la formation d'un autre anneau comparable, à certains égards, à la cyclisation d'un sucre de nature cétofuranose. La formation de ce deuxième anneau résulte de la saturation de la double liaison entre C_2 et C_3 au moyen de l'hydroxyle situé en C_6. Le composé ainsi obtenu constitue l'acide iso-diméthyl 2 - 3 ascorbique (IX).

Si l'on traite celui-ci par de l'acide chlorhydrique dans du méthanol, il y a élimination d'un groupement méthyle, ouverture du deuxième anneau, et l'on obtient l'acide 2 méthylascorbique, ce qui démontre bien le mode d'attache de l'anneau.

L'acide 2 - 3 diméthylascorbique (VII) de même que l'acide iso-diméthyl 2 - 3 ascorbique (IX) traités par l'ammoniaque méthylalcoolique fournissent une amide bien définie : $C_8\ H_{15}\ O_6\ N$ qui cristallise avec une molécule de méthanol. La structure de cette amide n'est pas encore déterminée exactement. Toutefois, comme elle ne réagit pas avec l'ozone et qu'elle ne possède pas d'absorption sélective, on pense qu'elle possède une structure analogue à celle de l'acide iso-diméthylascorbique, et on la représente provisoirement par la formule (X).

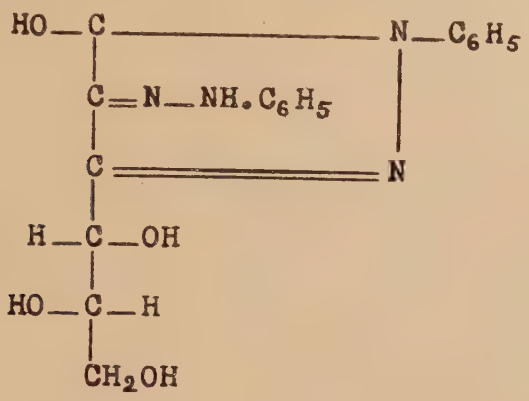
L'étude de l'acide diméthylglucoascorbique a permis d'observer des changements analogues de la structure normale en structure iso.

Action de la phénylhydrazine

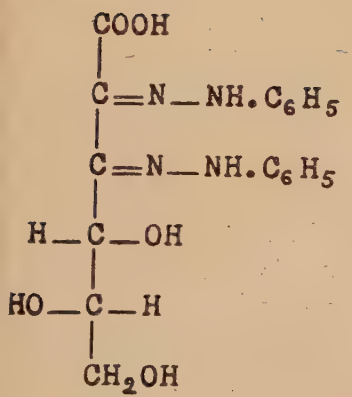
L'attribution de formules de structure aux composés résultant de l'action de la phénylhydrazine sur l'acide ascorbique a posé un problème très délicat, si l'on tient compte

des nombreuses possibilités d'isomérie et de tautomérie. Ce point fut élucidé complètement par Ohle et Böckmann (66).

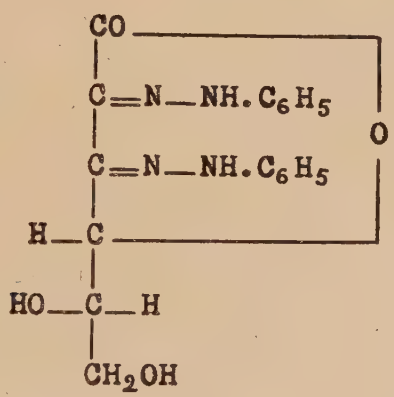
Lorsque la condensation avec la phénylhydrazine a lieu en présence d'acide acétique, on obtient un dérivé jaune (XI) qui a la structure d'un pyrazolone et dont le point de fusion est de 210°. Par contre, si l'on opère en présence d'un acide minéral, il se forme une très petite proportion de pyrazo



(XI)



(XII)



(XIII)

lone (XI) et le produit est composé d'un mélange de (XII) et de la lactone (XIII) du corps (XII). Cette lactone est un produit rouge (point de fusion = 197°) et c'est elle qui est la véritable osazone.

Il faut noter d'ailleurs que la substance (XII) donne faci-

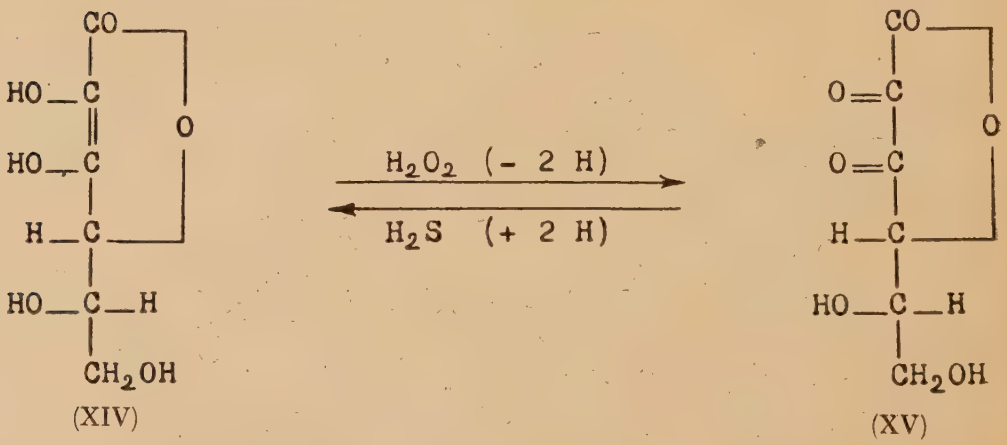
lement l'osazone (XIII) par recristallisation. Quant à l'osazone, elle peut être à son tour transformée en dérivé de pyrazolone.

Le dérivé obtenu avec la 2 -4 dinitrophénylhydrazine est particulièrement facile à préparer en présence d'acide chlorhydrique. C'est un beau précipité rouge (F = 270°) soluble dans l'alcool bouillant.

Oxydation

Oxydation chimique

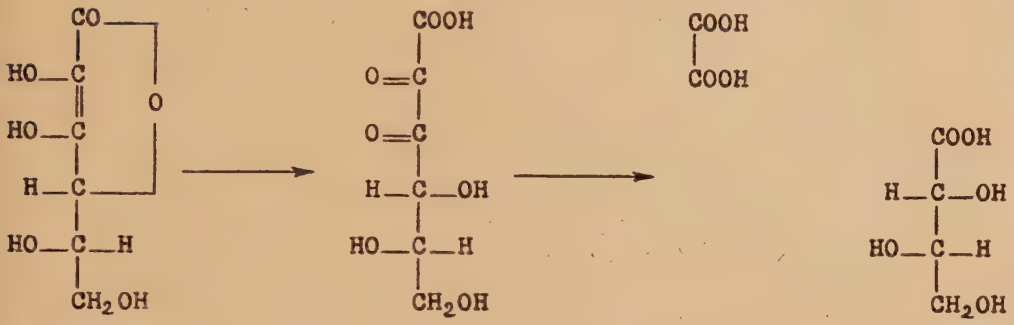
L'acide ascorbique (XIV) peut être oxydé par étapes. Soumis à l'action de l'eau oxygénée ou de l'iode, on observe le départ de deux atomes d'hydrogène pris sur les deux fonctions énoliques, et il y a transformation en un dérivé dicétonique : l'acide déhydroascorbique (XV). Ce dernier peut être réduit à nouveau à son état antérieur au moyen de l'hydrogène sulfuré.



(XIV) (XV)

Poussée plus loin, l'oxydation de l'acide ascorbique fait apparaître des fonctions carboxyles, puis provoque la coupure de la molécule et, de ce fait, la réaction perd toute sa reversibilité. Ainsi, l'oxydation de l'acide ascorbique (XIV) par l'hypoiodite de sodium fournit, avec un rendement presque théorique de l'acide oxalique (XVII) et de l'acide l thréonique (XVIII) qui résultent de la coupure de la molécule de l'acide dicéto - 2 - 3 - l gulonique (XVI).

L'acide ascorbique, lorsqu'il est traité en solution neutre ou légèrement alcaline et à l'abri de l'air par le sulfate de fer ne donne aucune coloration. Mais si l'on agite cette solution en l'exposant à l'air, il se forme un complexe bleu foncé contenant 22 % de fer. Le fait que cette réaction n'a lieu qu'en présence d'oxygène montre bien qu'il s'agit d'une



(XIV) (XVI) (XVII) (XVIII)

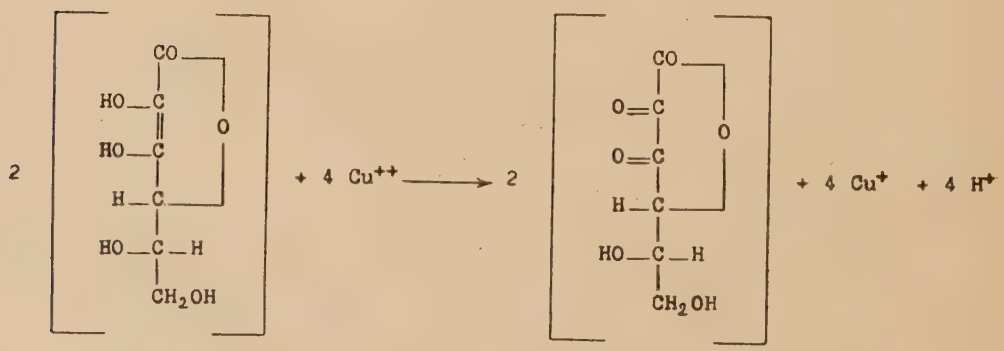
oxydation. Ce complexe, qui est optiquement inactif, précipite par l'alcool, l'acétone et le dioxane. Traité par l'hydrogène sulfuré, il ne redonne pas l'acide ascorbique. Conservé au contact de l'air, il se décompose au bout de quelques jours en oxalate ferreux. Enfin, des essais biologiques montrent que la solution du complexe ne contient plus de vitamine C (67)

Mouriquand et ses collaborateurs (68) ont d'ailleurs décrit ces complexes colorés (ferro et ferriscorbone), qui sont extrêmement avides d'oxygène gazeux. Les isomères de l'acide ascorbique donnent des réactions analogues.

L'oxydation de l'acide ascorbique en solution pure comme en milieu biologique est en grande partie conditionnée par le pH du milieu. On peut dire, d'une manière générale, que son oxydabilité augmente avec le pH. En effet, en solution acide ou neutre jusqu'à pH 7, l'acide ascorbique n'est pas autoxydable en présence de l'oxygène de l'air. L'acidité stabilise directement les solutions pures et indirectement les milieux biologiques en neutralisant l'action des diastases ou des catalyseurs qui peuvent s'y trouver. En milieu alcalin et au contact de l'air, l'oxydation est très rapide, et cela d'autant plus que le pH est élevé.

Il est à remarquer cependant que, pour un même pH, la vitesse d'oxydation dépend aussi du radical acide, car certains anions ont un pouvoir antioxydant plus accentué que d'autres. Ainsi, Bezssonoff estime que les acides nitrique et orthophosphorique ne s'opposent pas autant à l'oxydation que les acides chlorhydrique et citrique. C'est en partant du même principe que Fujita et Iwatake (624) préfèrent l'acide métaphosphorique à l'acide trichloracétique pour extraire des tissus la vitamine C.

Bien que très stable en milieu acide, des traces de fer ou de cuivre (69) peuvent catalyser l'oxydation de l'acide ascorbique qui est alors transformé en acide déhydroascorbique. En effet, tandis que l'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique, le catalyseur est réduit. Ce dernier, oxydé à son tour par l'oxygène atmosphérique, se trouve régénéré, en même temps qu'il y a formation d'eau oxygénée qui se dissocie en eau et oxygène. Donc, finalement, il y a dépense d'un atome d'oxygène, par molécule d'acide ascorbique. Cette oxydation catalytique peut être schématisée ainsi :



$$4\ Cu^{+} + 4\ H^{+} + 2\ O_2 \longrightarrow 4\ Cu^{++} + 2\ H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

L'acide déhydroascorbique ne possède plus de propriétés acides (55). On peut le réduire à nouveau en acide ascorbique au moyen de l'hydrogène sulfuré, en ayant soin d'opérer en milieu acide. Par contre, l'hydrogénation

catalytique (palladium colloïdal) ne réduit pas l'acide déhydroascorbique.

Il est à noter enfin que l'action catalytique du fer et du cuivre sur l'oxydation de la vitamine C peut être complètement inhibée par le cyanure de potassium M/100 et jusqu'à 80 % par des mélanges de CO/O_2 dans le rapport de 95/5.

Oxydation physico-chimique

Fox et Lévy (70) ont étudié l'action d'un charbon particulier, le « *norite charcoal* » sur des solutions pures d'acide ascorbique. Ils ont montré que, sous l'influence du charbon norit, l'acide ascorbique est transformé en acide déhydroascorbique. Toutefois, il y a une perte légère due au fait qu'une très petite quantité de la vitamine C a été transformée en acide irréversiblement oxydé.

Une faible quantité de charbon norit suffit pour obtenir la réaction. Or, étant donné qu'elle est rapide et proportionnelle à la quantité étudiée, la réaction se différencie nettement de celle qu'on a observée avec des traces de fer et de cuivre.

Il s'agit donc vraisemblablement d'un transport direct de l'oxygène adsorbé par le « *norite charcoal* ».

En tout cas, c'est là un procédé très pratique pour oxyder modérément l'acide ascorbique sans obtenir en même temps trop de sous-produits gênants. L'acide déhydroascorbique ainsi préparé reste stable plusieurs jours, à condition de le saturer de gaz carbonique et de le conserver à la glacière.

Oxydation diastasique

Comme il était facile de le supposer, on trouve dans le règne végétal des diastases susceptibles de transformer spécifiquement l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique ou même de pousser l'oxydation beaucoup plus loin

Bezssonoff avait constaté que le broyage des fruits et des légumes amenait une diminution rapide du pouvoir antiscorbutique, mais que cette perte en vitamine C était susceptible d'être retardée par acidification du milieu. Il en avait conclu à la présence de diastases oxydantes.

Tauber et Kleiner (136) ont isolé des diastases de ce genre à partir de la courge potiron (Cucurbita maxima). Ils ont

d'ailleurs mis à profit cette découverte. En effet, en se basant sur la différence des valeurs de réduction de l'acide ascorbique sur le ferricyanure de potassium avant et après l'action d'un extrait alcoolique de cucurbita maxima, ils ont pu établir ainsi une méthode diastasique de dosage de la vitamine C.

Zilva [72], étudiant l'action d'une oxydase de la pomme (Var. Bramley's - Seedlings) sur l'acide d glucoascorbique, a montré qu'il y avait une action reversible. En effet, cette oxydase peut, non seulement transformer l'acide d glucoascorbique en acide déhydro correspondant, mais encore réduire ce dernier en redonnant de l'acide d glucoascorbique. Ce fait n'a d'ailleurs rien d'étonnant, puisqu'il concorde parfaitement avec l'action réversible des diastases en général.

Dès lors, on conçoit l'importance biochimique de cette réaction réversible acide ascorbique $\rightleftharpoons$ acide déhydroascorbique. En effet, dans les milieux biologiques, on trouve, d'une part, des catalyseurs favorisant l'oxydation (diastases, sels de cuivre, phénols, colorants, ions OH, etc.) et d'autre part des corps exerçant une action antioxydante (oxyde de carbone, protéines, acides aminés et en particulier le glutathion et la cystéine). Il existe donc dans les organismes vivants un équilibre constant entre la forme réduite et la forme oxydée de l'acide ascorbique. Aussi la vitamine C joue-t-elle un rôle de premier plan comme transporteur d'hydrogène.

Existence d'une forme oxydée intermédiaire entre la vitamine C et l'acide déhydroascorbique

La réaction réversible acide ascorbique $\rightleftharpoons$ acide déhydro-ascorbique est en réalité plus complexe qu'elle ne le paraît au premier abord.

Ball [73] de même que Wurmser et de Loureiro [56] ont pu calculer le potentiel d'oxydo-réduction normal du système. Il est égal au pH 7 et à la T°30° à + 66 m. v. ce qui correspond à un rH 16,2.

Cependant, Wurmser et de Loureiro [74] pensaient qu'il existait un deuxième niveau d'oxydo-réduction de la vitamine C, et ils croyaient que ce deuxième stade de l'oxydation réversible de la vitamine correspondait à la perte de 4 H et,

par conséquent, à l'apparition de formes plus oxydées que l'acide déhydroascorbique.

Mais une oxydation de la vitamine correspondant à une perte de 4 H ne peut avoir lieu qu'en milieu neutre ou alcalin. Or, au pH $>$ 4, les formes oxydées réversibles de la vitamine sont déjà détruites très rapidement. D'autre part, Borsook et ses collaborateurs (57) ont montré que la perte de 4 H conduisait à l'acide dicéto l gulonique dont la formation irréversible s'effectue spontanément au pH $>$ 4. Comme nous l'avons vu, ce corps dénué de tout pouvoir antiscorbutique donne, en s'oxydant, les acides oxalique et thréonique. Par conséquent, un système réversible complexe du type :

vitamine C $\rightleftharpoons$ (vitamine C — 2 H) $\rightleftharpoons$ (vitamine C — 4 H)

ne peut exister. La chaîne des équilibres se trouve, en effet, interrompue par une réaction irréversible donnant naissance à des corps privés de toute action antiscorbutique. Cependant différentes observations confirmèrent l'existence d'un deuxième niveau d'oxydo-réduction.

a) Cherchant à établir un procédé de dosage de la vitamine C, Becker et di Gleria (75) commencèrent à établir des courbes de titration potentiométriques de la vitamine pure, oxydée graduellement par l'iode ou le dichlorophénol-indophénol. Le point d'inflexion de ces courbes, qui marque le potentiel d'équilibre de la vitamine à demi-oxydée, correspond à un rH voisin de 21.

b) Bezssonoff et Mme Woloszyn (76) ont montré que si l'on introduit dans le suc de citron du dichlorophénol- indophénol en léger excès, et ensuite le réactif de Bezssonoff, on constate la présence de l'acide ascorbique non oxydé en quantité notable. Ce phénomène prouve que la forme réduite de la vitamine se maintient en présence de la forme oxydée du dichlorophénol-indophénol, donc à un rH voisin de 21,3.

c) D'après le dosage spectrophotométrique de Chevallier et Choron (77), la teneur totale de la vitamine C dans le sang des mammifères, y compris les formes oxydées réversiblement, s'approche en moyenne de 20 mgr. par litre. Le sang du cobaye non carencé éprouvé au réactif de Bezssonoff, accuse une teneur en vitamine C sous la forme réduite (acide

ascorbique de 2,5 à 3,5 mgr. par litre [78] et d'après le procédé de MEUNIER [59], de 3 à 5 mgr. Le sang contient donc un mélange de formes réversibles, réduites et oxydées, de la vitamine, avec une prépondérance marquée de la dernière. Or, d'après VLÈS, REISS et DELOYERS [80], le rH du sang circulant est voisin de 22.

Donc, suivant les conditions auxquelles il est soumis, le système de la vitamine C se trouve en état d'équilibre à deux niveaux d'oxydo-réduction très différents correspondant aux rH 16 et rH 21. Ceci indique la complexité du système et démontre l'existence d'une forme oxydée réversible autre que l'acide déhydroascorbique. Puisqu'il ne peut s'agir d'un produit résultant du départ de 4 H, cette forme est donc intermédiaire entre l'acide ascorbique (forme réduite) et l'acide déhydroascorbique (forme oxydée). Elle constitue une forme semi-oxydée et l'on peut alors représenter ainsi ce système réversible complexe :

$$\text{Vitamine C} \rightleftarrows (\text{vitamine C} - \text{H}) \longrightarrow (\text{vitamine C} - 2\,\text{H})$$

L'existence de cette forme semi-oxydée (ou acide monodéhydroascorbique) a été démontrée par les remarquables travaux de BEZSSONOFF et Mme WOLOSZYN [76], [81], [82].

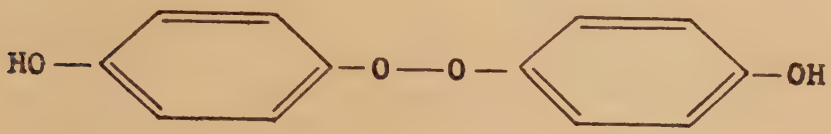
Ces auteurs basent leurs conclusions sur deux procédés très différents :

a) l'étude du rapport entre la quantité d'oxygène gazeux fixé par une solution de vitamine et la quantité de l'acide ascorbique oxydé.

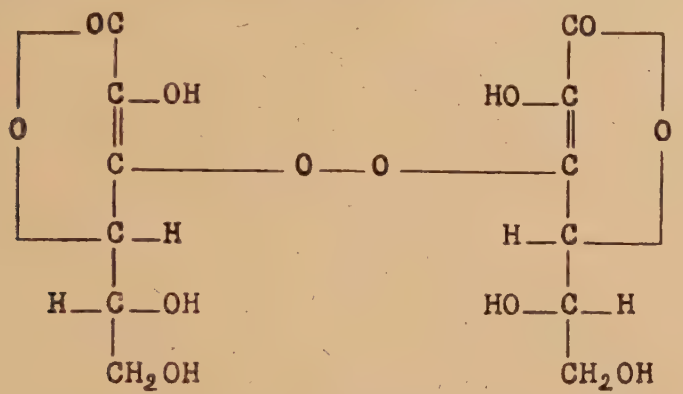
b) les réactions réversibles de la vitamine C avec l'acide phosphomolybdique, dont les colorations bleues et vertes correspondent à deux stades de l'oxydation de l'acide ascorbique.

Cette forme semi-oxydée (vitamine C — H) correspond à l'absorption d'un atome d'oxygène par deux molécules d'acide ascorbique. On la désigne par la formule générale $n\,(C_6\,H_7\,O_6)$. En raison de la similitude des réactions colorées de la vitamine et de l'hydroquinol, on serait tenté d'assimiler la forme (vitamine C — H) à un composé complexe (vitamine C + acide déhydroascorbique) analogue au quinhydrol. Toutefois, la structure du quinhydrol lui-même n'est pas clairement établi. On suppose que ce corps n'est pas un composé complexe (hydroquinol + benzoquinone)

mais qu'il est un oether de l'hydroquinol correspondant à la formule :



Dans ce cas, sa structure serait analogue à celle d'un oether ascorbique que l'on pourrait représenter ainsi :



Mais une telle substance n'a encore jamais été isolée. Diverses considérations incitent Bezssonoff et Mme Woloszyn à penser que la forme (vitamine C — H) s'identifierait avec l'oether ascorbique plutôt qu'avec un composé complexe (vitamine C + acide déhydroascorbique).

Pouvoir réducteur

L'acide ascorbique possède un pouvoir réducteur très accentué. Il réduit la liqueur de Fehling à froid, le permanganate de potassium en milieu neutre ou alcalin. Il réduit le nitrate d'argent, même en milieu acide, ainsi, à pH 2, 6, la réaction se fait encore, ce qui d'après Giroud et Leblond, serait caractéristique de ce corps.

Dans l'intervalle des pH compris entre 6 et 9,3, l'acide ascorbique ne réduit pas les solutions aqueuses des nitrates en nitrites. Mais, en milieu neutre ou acide, les nitrites dégagent de l'oxyde azotique. L'addition de chlorure d'ammonium favorise cette réaction (83).

Il réduit le chlorure d'or et l'acide sélénieux en donnant des solutions colloïdales métalliques. La solution colloïdale réduite de l'acide sélénieux (5 %) prend une coloration rouge orangée en présence de gomme arabique. Il est à noter que la réduction de l'acide sélénieux (ou d'une solution récente de sélénite) se fait à froid et aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide, ce qui différencie l'acide ascorbique des autres substances réductrices de l'acide sélénieux (84).

Il réduit l'iode, le ferricyanure de potassium, l'acide phosphomolybdotungstique, le dichlorophénol-indophénol, etc.

Emmerie (85) a montré que la présence de glutathion ou de cystéine inhibait ces réductions.

La plupart des réactions colorées ou des méthodes de dosage de la vitamine C sont basées sur le grand pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Pouvoir catalytique

L'acide ascorbique, comme le laissaient prévoir certaines des propriétés que nous venons d'exposer, est susceptible d'exercer un certain nombre d'actions catalytiques.

Il facilite l'autoxydation du sucre (en milieu phosphaté neutre) de l'huile de lin (86) et de l'acide lactique (87). Il catalyse la transformation de l'aldéhyde formique en sucre réducteur en présence d'hydroxyde de calcium (88).

Le pouvoir réducteur et catalytique des acides ascorbique et isoascorbique est utilisé par Britzinger (89) pour la préparation des solutions colloïdales d'argent, d'or, de platine. de palladium, de sélénium, de tellure, de bleu de tungstène et de bleu de molybdène.

S'il a subi une oxydation par l'oxygène atmosphérique, l'acide ascorbique perd son pouvoir catalytique. De même, l'acide cyanhydrique et le sulfate de cuivre suspendent son activité (86).

Fermentescibilité

L'acide ascorbique n'est pas fermentescible, comme le laisse prévoir la théorie de Gabriel Bertrand appliquée à sa configuration stéréo-chimique.

Stabilité

L'acide ascorbique est assez stable en milieu biologique (jus de citron). Par contre, il est rapidement détruit par l'eau pure [90]. Une solution d'acide ascorbique exposée à l'air s'altère rapidement. Au bout de 24 heures, on ne trouve plus que 64 % d'acide ascorbique et 27 % après 48 heures. Dans une atmosphère de gaz carbonique, la solution reste intacte durant trois mois [91].

La stabilité des solutions s'accroît avec la concentration en acide ascorbique.

Comme nous l'avons vu, l'oxydabilité de l'acide ascorbique augmente avec le pH du milieu. Par conséquent, les solutions acides sont stables (à moins que des traces de fer ou de cuivre ne catalysent l'oxydation), tandis qu'en milieu alcalin, l'altération est très rapide [92], [93].

Si l'on veut préparer des solutions d'acide ascorbique susceptibles d'être conservées plusieurs jours, il est bon d'utiliser la technique de KLEINER et TAUBER qui emploient comme agent de stabilisation le chlorhydrate de cystéine.

Action de la lumière

L'acide ascorbique est photolabile. L'exposition à la lumière du jour, pendant dix minutes, d'une solution d'acide ascorbique pur à 0 gr. 01 p. 100 amène une perte de 30 % [94]. De même, KON et WATSON [95] ont constaté une perte de 50 % dans du lait exposé à la lumière solaire pendant 30 minutes.

Mais les expérimentateurs ne sont plus d'accord quand il s'agit de déterminer quelles sont les radiations les plus actives. REYHER [96] ainsi que KON et WATSON [95] estiment que les rayons ultra-violets et les rayons visibles de faible longueur d'onde (violet, indigo, bleu) sont les plus nuisibles. HOTTINGER [97] dénie toute action destructrice aux rayons ultra-violets. Cette opinion est partagée par MENTZER et VIALARD-GOUDOU [94] qui prétendent au contraire que l'action destructrice des radiations augmente avec leur longueur d'onde.

En tout cas, c'est l'action de la lumière blanche qui s'est révélée la plus nocive, et ce fait a été mis à profit dans certaines méthodes de dosage de l'acide ascorbique (MARTINI et BONSIGNORE, CHEVALLIER et CHORON).

Action de la chaleur

Chauffé lentement vers 170°, l'acide ascorbique se décompose en dégageant du gaz carbonique.

Une recrudescence du scorbut infantile fut observée au début de ce siècle. Pensant que l'abus de la stérilisation et de la pasteurisation du lait était la cause de ce phénomène, on étudia tout particulièrement l'effet de la chaleur sur la vitamine C.

Sherman et ses collaborateurs [98] ont montré que l'action de la chaleur et de la cuisson altérait nettement la vitamine C. Mais, par la suite, de nombreux auteurs, Eddy [99], Mouriquand [100] et Richet [101] ont prouvé que la stérilisation par elle-même ne détruit pas l'acide ascorbique. Contrairement à ce que l'on a cru pendant longtemps, la vitamine C est thermostable à condition, toutefois, que certaines précautions soient prises pendant la préparation et la stérilisation. C'est uniquement la présence de l'oxygène qui provoque la destruction de la vitamine C. L'élévation de la température a simplement pour effet d'accélérer cette oxydation.

Réactions colorées

Comme nous l'avons signalé précédemment, la plupart de ces réactions sont dues au grand pouvoir réducteur de la vitamine C.

L'acide ascorbique donne la réaction de Molish (coloration pourpre avec le naphtol et l'acide sulfurique) et la réaction de l'orcine [102].

Avec l'ortho-dinitrobenzène en présence de CO_3Na_2, il donne une coloration violette intense [103].

La réduction, par la vitamine C, de l'acide sélénieux ou d'une solution fraîche de sélénite se fait à froid et aussi bien en milieu acide qu'en milieu alcalin. Ceci différencie l'acide ascorbique des autres substances réductrices de l'acide sélénieux [84].

Avec le réactif de Bezssonoff (acide monomolybdophosphotungstique) l'acide ascorbique donne une coloration bleue. Cette réaction n'est pas rigoureusement spécifique, car elle est positive avec de nombreux corps possédant le groupement diénolique ou orthodiphénolique [104], [105], [106].

Toutefois, Bezssonoff a pu mettre au point une technique de dosage très intéressante basée sur cette réaction .

L'acide ascorbique réduit le dichloro 2 - 6 - phénol - indophénol (107). Cette propriété a été utilisée par différents auteurs pour établir un dosage colorimétrique.

L'addition de sulfate ferreux à une solution faiblement alcaline d'acide ascorbique donne, au contact de l'air, une coloration violet foncé. La solution redevient incolore par l'action de l'hydrosulfite (67).

En raison de ses oxhydryles énoliques, l'acide ascorbique ou ses sels donne avec le perchlorure de fer une coloration violette intense. Avec le nitroprussiate on obtient une coloration bleu foncé, virant ensuite au vert, puis au rouge (19).

En présence de carbonate de sodium, une solution sulfurique d'acide ascorbique et de sulfate de titane se colore en rouge brun (108). Cette réaction n'est d'ailleurs pas spécifique.

Si, à une solution très légèrement alcaline d'acide ascorbique, on ajoute une solution d'acétate d'urane à 10 %, on observe une faible coloration brune qui disparaît si on alcalinise franchement. Avec une solution d'acide isoascorbique, au contraire, on observe, en présence des alcalis, le renforcement de cette coloration en rouge brun (109).

En milieu alcalin, l'acide ascorbique donne la diazoréaction à la para-nitraniline, et l'on obtient une couleur rouge orangée (110). Examinant au spectrographe la diazocouleur correspondant à une solution de 50 mgr. pour 100 d'acide ascorbique, Barac a noté qu'elle présentait un sommet large et continu dans la zone comprise entre 4.600 et 4.900 A. Il ne faut pas oublier toutefois que de nombreux composés (phénols, imidazols, etc.) sont susceptibles de donner une diazoréaction du même genre. Ce caractère n'est donc pas spécifique.

Tauber (111) a signalé une réaction à la touche qui est très sensible. Ce procédé est basé sur la réduction d'une solution de ferricyanure de potassium à 0 gr. 4 pour 100. On fait l'extraction des tissus à chaud avec de l'acide acétique à 8 %. On met une goutte de l'extrait acétique sur du papier filtre double. Le papier supérieur sert à filtrer les gouttes. Sur le papier inférieur, on fait tomber une goutte de la solution de ferricyanure et une goutte d'une solution de sulfate ferrique à 1 % contenant 18 cc. d'acide phosphorique à 85 % et à laquelle on a ajouté du permanganate de potas-

sium jusqu'à coloration rose. Si, au bout d'une minute, on observe une coloration bleue, il y a présence d'acide ascorbique. On peut, par cette méthode, déceler jusqu'à 0,003 mgr. de vitamine C dans 0,05 cc. de liquide. Toutefois, cette réaction ne peut avoir lieu en présence de quantité importantes de glutathion, de cystéine ou de pyrogallol.

Paget et Berger (112) identifient l'acide ascorbique en caractérisant l'acide oxalique qui résulte de son oxydation. La vitamine C, en effet, est très facilement oxydable. Traitée à froid par le permanganate de potassium en milieu acide, elle est rapidement transformée en un mélange d'acide l thréonique et d'acide oxalique. Ce dernier est facile à caractériser d'une manière spécifique par la réaction de Schryver-Fosse, modifiée par Paget et Berger. Voici la technique recommandée par les auteurs :

A 1 cc. d'une solution fraîche d'acide ascorbique au millième on ajoute à froid 1 cc. d'acide acétique au 1/10 et 0,5 cc. d'une solution de permanganate de potassium à 3 pour 100. On agite une minute et on laisse ensuite en contact durant trente secondes environ. Si besoin est, on décolore par une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.

Dans le liquide incolore, on place une lame de zinc pur. On laisse la réduction s'opérer pendant trois minutes. On transvase le liquide dans un tube Pyrex. On ajoute deux gouttes d'une solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 pour 100, on porte à l'ébullition naissante, puis on refroidit sous un courant d'eau froide. On ajoute 2 cc. d'acide chlorhydrique concentré, puis deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes (ou deux gouttes de solution de ferricyanure de potassium à 5 pour 100). Il se développe une coloration dont la teinte varie du rose au rouge selon la concentration. Avec le ferricyanure de potassium, la coloration apparaît plus rapidement, mais elle est moins pure qu'avec l'eau oxygénée.

Signalons enfin que la réduction du nitrate d'argent par l'acide ascorbique a servi à effectuer des recherches histochimiques de la vitamine C (113), (114), (115).

Remarque sur l'acide déhydroascorbique

L'acide déhydroascorbique a été tout particulièrement étudié par Moll et Wieters (116), qui le préparent sous forme de solution en oxydant l'acide ascorbique par de la

quinone. On ne semble pas être parvenu encore à l'isoler à l'état solide.

Ses solutions sont sensiblement neutres et beaucoup moins stables que celles de l'acide ascorbique. Mais cette instabilité ne provient pas de l'action de l'oxygène atmosphérique. Divers facteurs : ionisation accentuée du milieu (alcalinisation ou acidification), élévation de la température, augmentent son instabilité et accélèrent sa destruction.

Avec les hydrazines, on obtient des osazones faciles à caractériser :

diphénylosazone	F = 216°	(116)
parabromophénylosazone	F = 230°-235°	(117)
dinitro 2-4- phénylosazone.....	F = 271°	(118)
benzylphénylosazone	F = 110°	(116)

Ces osazones s'obtiennent également à partir de l'acide ascorbique qui, sous l'action de la phénylhydrazine, subit d'abord une déshydrogénation et se transforme en acide déhydroascorbique.

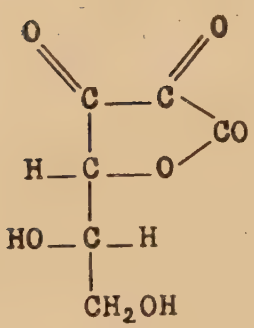
Si l'on chauffe l'acide déhydroascorbique avec des monoamines, il se décompose avec dégagement de CO_2. Par contre, il se combine de manière presque quantitative avec certaines diamines en donnant des composés solides cristallisés dont la coloration et le point de fusion peuvent servir à le caractériser (116), (63), (120).

L'intérêt que présente l'acide déhydraoscorbique réside dans le fait qu'il jouit d'une activité physiologique à peu près identique à celle de la vitamine elle-même. *Per os*, il est aussi actif que l'acide ascorbique, mais il l'est un peu moins par voie parentérale.

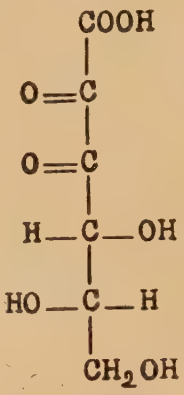
Toutefois, sa chimie, très compliquée, n'est pas encore complètement établie. Au moment de sa formation, il a la structure (XV), mais certains faits (absence de coloration de ses solutions aqueuses) font admettre qu'il peut subir l'hydratation de l'un ou de plusieurs de ses groupements cétoniques. En présence d'eau ou d'alcali, il est évident qu'il y aura ouverture de l'anneau et l'acide dicéto 1 gulonique (XVI), ainsi formé, jouira de nouvelles propriétés réactionnelles.

En effet, l'acide dicéto 1 gulonique peut réagir de différentes façons comme sucre cétosique possédant une structure cyclique. Le mélange résultant est très complexe,

comme le montrent les changements compliqués du spectre d'absorption, de la rotation, etc..., que l'on peut observer pendant que s'établit l'équilibre en solution aqueuse.



(XV)



(XVI)

La complexité du phénomène est encore augmentée du fait que l'acide déhydroascorbique peut être réduit quantitativement par l'hydrogène sulfuré, alors que le mélange d'équilibre n'est pas réductible par ce réactif, mais donne cependant de l'acide ascorbique si on le réduit par l'acide iodhydrique [20]. En accord avec ces modifications, on peut observer des variations complexes du potentiel d'oxydo-réduction. Différentes phases comportant des transformations de structure ont été décelées au cours de ces études, mais leur interprétation au moyen de formules de constitution ne peut être envisagée actuellement [57].

CHAPITRE V

Dosage de la Vitamine C

METHODES BIOLOGIQUES

Les méthodes biologiques dérivent des travaux de Holst et Fröhlich (606). Le cobaye est pratiquement le seul animal utilisable. Il suffit de le soumettre pendant quelques temps à un régime carencé en vitamine C, pour voir apparaître successivement les différents symptômes du scorbut.

La difficulté de cette méthode consiste à trouver un régime carencé en vitamine C, mais capable néanmoins de satisfaire tous les autres besoins de l'organisme. De nombreuses formules ont été indiquées par Givens et Cohen (607), Lewis (608), Hart, Steenbock et Ellis (609), Carey et Haugh (610), Mills et Innes (611), Delft (612), Key et Elphick (613), Westin (614), Lund, Spur et Friderica (615), Shermann la Mer et Campbell (616), Bezssonoff (617), Randoin et Lomba (618).

Le régime scorbutigène de Bezssonoff est composé de 900 grammes d'avoine, 100 grammes de son, 40 grammes de levure, 75 grammes de jaune d'œufs frais et d'eau.

La formule la plus utilisée est celle de Randoin et Lomba :

Farine de haricots blancs.....	83	grammes
Levure de bière.....	3	—
Graisse de beurre purifiée.....	5,50	—
Lactate de calcium.....	5	—
Chlorure de sodium.....	1,50	—
Papier filtre (cellulose).....	2	—

Ce régime strictement scorbutigène demeure équilibré biochimiquement, puisqu'il contient tout les autres éléments

d'un régime complet. Le papier filtre a pour but de parer à la constipation éventuelle provoquée par l'absence de cellulose naturelle.

Le poids du cobaye soumis à ce régime continue à augmenter pendant dix à quinze jours (période eutrophique) puis reste stationnaire et finit par diminuer progressivement (période dystrophique). Dès la troisième semaine se manifestent les symptômes du scorbut (enflures des articulations, diarrhées, hémorragies multiples, etc.), et l'animal meurt vers la fin de la quatrième semaine.

Pour apprécier la valeur antiscorbutique d'un produit, on peut utiliser deux procédés :

a) *Méthode préventive.* — On détermine la dose quotidienne minima qui, administrée à l'animal en expérience, suffit à empêcher l'apparition du scorbut.

b) *Méthode curative.* — On détermine la dose quotidienne minima qui, administrée à l'animal dès l'arrêt de la croissance, redonne à celle-ci son allure normale.

On doit opérer sur des animaux de même âge et de même poids (250 à 400 gr.). Avant de commencer l'expérience, il est bon d'habituer les cobayes à ce régime en le leur administrant pendant quelques jours en même temps que des légumes verts.

Les animaux sont divisés en trois lots :

Lot n° 1 = Régime alimentaire normal.
Lot n° 2 = Lot témoin : Régime scorbutigène strict.
Lot n° 3 = Lot dosage : Régime scorbutigène additionné préventivement ou curativement (suivant la méthode employée) de la substance à doser.

Dès le début de l'expérience, on établit pour chaque sujet une fiche avec courbes de poids et de température, signes cliniques et anatomiques, etc.

On admet que la dose minima journalière de vitamine C nécessaire à un cobaye normal est de 0,50 mgr. On peut donc, par comparaison, apprécier approximativement la quantité d'acide ascorbique contenu dans la substance à doser.

Les inconvénients de cette méthode sont nombreux : elle est longue, coûteuse, peu précise et inapplicable à des solutions dont la teneur en vitamine C diminue rapidement (lait, etc.). Elle a cependant l'avantage d'être spécifique, et

c'est pourquoi on l'emploie encore pour vérifier si la substance dosée par les méthodes chimiques est bien de l'acide ascorbique.

METHODES CHIMIQUES

Par rapport aux autres vitamines, l'acide ascorbique agit à doses relativement élevées. D'autre part, en raison de son grand pouvoir réducteur, il est susceptible de fournir de nombreuses réactions colorées. Il est donc plus commode de doser la vitamine C par des méthodes chimiques, plus rapides et plus précises que les méthodes biologiques.

Le nombre de techniques proposées depuis une dizaine d'années se révèle très important. Si la plupart se montrent suffisamment exactes quand il s'agit de solutions pures, il n'en va pas de même dans le domaine biologique. En effet, ces procédés étant généralement fondés sur le potentiel élevé de l'acide ascorbique et sur son action réductrice vis à vis de certains réactifs, il est logique de penser que d'autres composés biochimiques sont susceptibles de réagir d'une manière analogue. Toutefois, bien des causes d'erreurs ont pu être éliminées par les expérimentateurs et les méthodes actuelles, considérablement perfectionnées, permettent de doser la vitamine C avec une précision satisfaisante.

Une étude complète et détaillée de ces divers procédés dépasserait largement le cadre de cette monographie. Nous nous bornerons donc à exposer succintement le principe de ces méthodes en précisant le détail des techniques les plus employées actuellement (*).

(*) On peut trouver d'utiles renseignements sur les méthodes de dosage de la vitamine C dans les ouvrages suivants :

I. ABELIN, *Chemische und biochemische Methoden zum Nachweiss und zur Wertbestimmung von Vitaminen*, in *Ztschr. anal. Chem.*, 1935, t. 102, pp. 70, 146.

Marcel FERRAND, *Etude critique de quelques méthodes chimiques de dosage de l'acide ascorbique*, Thèse de Pharmacie, Lyon, 1936.

Pierre ANCEAUX, *La vitamine C dans le lait*, Thèse de Pharmacie, Lille, 1939.

Charles MENTZER, *Contribution à l'étude biochimique de l'acide ascorbique*, Thèse de Pharmacien Supérieur, Paris, 1940.

G. STIRNER, *Chemische und Physikalische Vitaminbestimmung Methoden*, F. Enke, éditeur, Stuttgart, 1941.

Paul MEUNIER et Yves RAOUL, *Le diagnostic chimique des avitaminoses*, Masson et Cie, éditeur, Paris, 1942.

I — Méthodes diverses

Nous signalerons pour mémoire quelques méthodes qui ne sont plus guère usitées :

1° Roe (619) transforme l'acide ascorbique en furfural et mesure colorimétriquement ce dernier par l'aniline. Comme d'autres composés (pentoses et acides uroniques) possèdent les mêmes propriétés, il est nécessaire d'effectuer une seconde détermination après destruction de la vitamine C par oxydation ménagée.

2° Bachstez et Cavallini (109) utilisent la coloration brun rouge obtenue en réduisant une solution d'acétate d'uranyle par l'acide ascorbique. Cette réaction manque de spécificité, car les tanins et les phénols donnent une coloration analogue.

3° Levine (84) et Emmerie (85) indiquent une réaction susceptible de permettre le dosage de la vitamine C.

L'acide ascorbique réduit l'acide sélénieux (solution aqueuse à 5 %) en présence d'une goutte de solution de gomme arabique en donnant une coloration orangé clair de selenium colloïdal. Cette réduction se fait à froid et aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide, ce qui différencie l'acide ascorbique des autres substances réductrices de l'acide sélénieux. Cette réaction est inhibée par la présence de glutathion ou de cystéine.

4° Emmerie (85) signale également la réaction suivante : Une solution d'acide ascorbique préalablement neutralisée par NaOH N/100, en présence de bleu de bromothymol, donne avec une solution de chlorure aurique (0,10 gr. pour 150 cc. d'eau distillée), neutralisée dans les mêmes conditions, une coloration rouge d'or colloïdal.

5° E. et A. Pitarelli (620) emploient l'action réductrice de l'acide ascorbique sur des réactifs au sulfocyanure ferrique ou cuivrique.

6° Tauber et Kleiner (71) utilisent la réduction du ferricyanure de potassium par l'acide ascorbique. En faisant réagir sur le ferrocyanure de potassium ainsi formé une solution de gomme ghatti ferrique, on obtient une coloration bleu de Prusse. On fait alors un dosage colorimétrique par comparaison avec une solution étalon d'acide ascorbique.

7° Méthode iodométrique. — L'acide ascorbique est oxydé par l'iode, qui le transforme en acide déhydroascorbique.

Ce procédé est à rejeter lorsqu'on opère dans des milieux biologiques complexes comme l'urine, car l'iode peut se fixer sur d'autres composés (dérivés aromatiques, thiosulfates, doubles liaisons, etc.).

II — Méthodes basées sur la réduction des complexes tungstiques

Méthode de Bezssonoff

Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide monomolybdo-phosphotungstique par l'acide ascorbique avec formation d'une coloration bleu violet stable, que l'on apprécie au colorimètre. Ce fut d'ailleurs la première réaction chimique employée pour la détermination approximative du pouvoir antiscorbutique des sucs végétaux, avant même que fût isolée la vitamine C.

Ce procédé assez simple n'était malheureusement pas spécifique, et il a été critiqué par Wedgerwood et Ford (622), von Euler et Burström (106) et de nombreux auteurs. En effet, la coloration violette est due à une réaction caractérisant la fonction diénol — C (OH) = C (OH) —. Par suite, en présence d'un excès de réactif, certains composés peuvent donner une coloration analogue.

Cependant, Bezssonoff et ses collaborateurs (623), (247), (196), (625), (208), (626), après avoir apporté différentes modifications à cette technique, sont parvenus à éliminer différentes causes d'erreur.

Si certains composés qui contiennent le groupement diénol (comme la réductone, l'hydroquinol, le quinhydrol, etc.) donnent la même réaction que l'acide ascorbique, il faut noter qu'il s'agit là de produits de laboratoire qui, à l'état libre, ne se rencontrent pas normalement dans les milieux biologiques. Par contre, divers polyphénols fréquents dans ces milieux, bien qu'ils contiennent le groupement diénol, ne donnent pas la réaction diénolique type. L'influence d'autres groupes ou noyaux contenus dans leur molécule provoque, en présence du réactif, une coloration initiale jaune brun, la réaction violette n'apparaissant qu'en présence d'un grand excès de réactif.

Quant à l'erreur possible provoquée par la présence d'acide urique, elle est due à une impureté du réactif.

L'élimination de l'acide urique permet d'éviter cet inconvénient.

Nous exposerons sommairement la technique actuelle de la méthode de Bezssonoff (*).

Principe. — L'acide monomolybdo-phospho-tungstique : (MoO_3) 17 (TuO_3) (P_2 O_5), 24 H_2O oxyde en solution aqueuse acide la vitamine C en donnant une coloration violette stable dont le spectre visible est caractérisé par une absorption dans la région de 5.750 Å. Cette coloration étant due à une oxydo-réduction irréversible, son intensité est exactement proportionnelle à la concentration de la vitamine dans le milieu, à condition de mettre en œuvre une quantité suffisante d'acide monomolybdophosphotungstique.

Technique. — 1° *Le réactif B.* — L'acide monomolybdophosphotungstique se trouve actuellement dans le commerce (Prolabo, 12, rue Pelée, Paris) sous le nom de Réactif de Bezssonoff. Si l'on désire le préparer, on doit opérer de la façon suivante :

On dissout dans 200 cc. d'eau redistillée sur le permanganate 44 gr. de tungstate de sodium et 2,7 gr. d'acide phosphomolybdique chimiquement purs. La solution est conservée à l'abri de la lumière pendant quatre jours, à la température ordinaire.

On filtre pour éliminer le léger dépôt cristallin qui s'est formé et on ajoute au filtrat 300 cc. d'eau distillée, 5 cc. d'acide orthophosphorique concentré (d = 1,71) et 40 cc. d'acide sulfurique à 25 % volumétrique. On place le mélange dans une capsule et on l'évapore au bain-marie sans dépasser 40° jusqu'à obtenir environ le quart du volume initial.

On décante pour isoler les cristaux jaunes pâles brillants

(*) La technique très détaillée de cette méthode avec son application au dosage de la vitamine C dans les différents milieux biologiques est exposées dans :

N. Bezssonoff et E. Stoerr, *Ztschr. fur Vitaminforschung*, 1936, t. 5, p. 193.

N. Bezssonoff et M. Woloszyn, *C. R. Soc. biol.*, 1937, 124, p. 353.

P. Rohmer et N. Bezssonoff, *Ztschr. fur Vitaminforschung*, 1942, 12, p. 104.

du réactif B, qui se sont formés au cours de l'évaporation. On les lave rapidement à trois reprises par de l'eau bi-distillée (10 cc. en tout). Après les avoir séchés entre deux feuilles de papier filtre, on dissout 30 gr. de cristaux dans 50 cc. d'eau bi-distillée.

Si la solution est trouble, on la filtre sur du papier préalablement lavé par de l'acide sulfurique tiède à 15 % volumétrique.

On maintient la solution à une température de 45° et on ajoute goutte à goutte, sans cesser d'agiter, 17,5 cc. d'acide sulfurique à 50 % volumétrique. On laisse refroidir la solution à l'abri de la lumière et au bout de six heures la cristallisation est achevée. On rassemble les cristaux sur un filtre lavé, on les rince à l'acide sulfurique à 15 % volumétrique et ensuite avec une très petite quantité d'eau bi-distillée .

Afin de vérifier la pureté du réactif, on introduit les dernières gouttes des eaux de lavage dans un tube à essai contenant une solution de pyrogallol à 1 o/oo. Le réactif pur donne une coloration jaune brun qui se conserve à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours. La présence d'impureté provoque un virage au violet. Si ce virage a lieu après deux heures d'attente, le réactif peut encore être utilise. S'il se produit plus tôt, on recommence de nouveaux lavages ou la recristallisation. Après l'épreuve, les cristaux sont rapidement séchés entre deux feuilles de papier filtre suédois.

On prépare deux solutions : la première contenant 2,5 gr. de réactif B et la deuxième 1 gr., dissout chaque fois dans 100 cc. d'acide sulfurique à 5 %. Les deux solutions sont conservées dans des flacons compte-gouttes en verre brun, donnant quinze gouttes par cc. Par conséquent :

Une goutte de la solution à 2,5 gr. % contient environ 1,7 mgr. de réactif B cristallisé ;

Une goutte de la solution à 1 gr. % contient environ 0,7 mgr. de réactif B cristallisé.

2° *L'unité colorimétrique.* — Pour mesurer l'intensité de la coloration violette, Bezssonoff utilise « *l'unité hydroquinol* » (U. H.). Une U. H. équivaut à l'intensité maxima de la teinte violette engendrée en présence du réactif B par 1 mgr. d'hydroquinol dissout dans un litre d'eau. Cette teinte égale en intensité celle que donne en présence du réactif B 1,8 mgr. d'acide ascorbique dissout dans un litre d'eau.

Cependant, si l'on a pour but unique le dosage de la vitamine C, il est plus commode de recourir à « *l'unité colorimétrique* » (U. C.), qui donne de suite la concentration de l'acide ascorbique en mgr par litre. Une U. C. correspond à la teinte violette que donne en présence du réactif B. 1 mgr. d'acide ascorbique par litre. Cette teinte égale en intensité celle que produisent 62,5 mgr. d'hydroquinol dissouts dans un litre d'eau.

Il faut 0,8 mgr. de réactif B. pour communiquer à 10 cc. d'une solution de vitamine C une teinte violette d'intensité égale à une U. C. Donc, une goutte de réactif à 2,5 gr. % apportant 1,7 mgr. de réactif cristallin suffit pour faire apparaître une coloration de deux U. C. dans 10 cc. de la solution essayée. De même, une goutte de réactif à 1 gr. % est suffisante pour provoquer une coloration de cette intensité dans 4 cc. de solution. Il est utile, quand on procède au dosage, d'avoir ces données présentes à l'esprit afin d'éviter d'introduire un excès de réactif.

3° *Préparation de l'étalon colorimétrique.* — La réaction violette de la vitamine C peut être appréciée jusqu'à une dilution de 0,1 mgr. d'acide ascorbique par litre à l'aide du Stufen Kolorimeter de PULFRICH (Zeiss). Si l'on ne dispose pas d'un colorimètre, il faut employer un comparateur et trois séries de dix tubes exactement calibrés en verre fin et incolore.

1re série — diamètre intérieur 12 mm. Les tubes sont gradués à 10 et 5 cc.

2e série — diamètre intérieur 8 mm. Les tubes sont gradués à 4, 3, 2 et 1 cc.

3e série — diamètre intérieur 6 mm. La capacité utile des tubes est de 3 cc., et ils sont gradués à 0,5 cc.

Solution d'hydroquinol. — On pèse exactement 125 mgr. d'hydroquinol et on les dissout dans une fiole jaugée contenant 200 cc. d'eau bi-distillée. Après avoir agité la fiole, on prend très exactement 1 cc. de cette solution, on l'introduit dans un fiole jaugée de 100 cc. et on complète avec de l'eau bi-distillée. Il est bon de remplacer l'eau par une solution de $SO_4 H_2$ très pur dans de l'eau bi-distillée à 5 % volumétrique. Dans ce milieu acide, l'étalon peut se conserver, à l'abri de la lumière, pendant trois jours.

On prend 1, 2, 3 et 4 cc. de cette solution et on les introduit respectivement dans quatre tubes de la première série. On

ajoute trois gouttes du réactif B à 2,5 gr. % dans chaque tube et on complète par de l'eau distillée (ou mieux encore par la solution de SO_4 H_2 à 5 %) jusqu'au trait de 10 cc. On mélange en imprimant aux tubes un mouvement de rotation. Au besoin on remplit avec les solutions colorées ainsi obtenues quatre tubes de la deuxième ou de la troisième série. Les étalons sont prêts à l'usage dix minutes après l'addition du réactif.

Si après la préparation du liquide biologique à examiner on dispose d'une quantité de ce liquide égale ou supérieure à 10 cc., on emploie la première série de tubes. Quand cette quantité est égale ou supérieure à 4 cc., on utilise les tubes de la deuxième série. Enfin on emploie la troisième série quand on ne dispose que d'une quantité de liquide comprise entre 3 et 1,5 cc.

L'intensité de la teinte violette dans les quatre tubes étalons est très faible. Avant de commencer les dosages, il faut s'exercer à distinguer les quatre tubes entre eux et le premier tube d'un tube rempli d'eau. On regarde les tubes en profondeur en se plaçant devant un verre dépoli éclairé par de la lumière artificielle.

Afin de caractériser et, au besoin, d'éliminer la teinte jaune brun provoquée parfois par certains composés, on prépare une solution jaune brun étalon : on dissout 1 gr. de tanin officinal dans un litre d'eau distillée contenant 20 cc. de formol. Cette solution, placée dans un flacon en verre brun, peut se conserver trois semaines. A partir de cette solution, on prépare une solution jaune brun fraîche chaque fois qu'il est nécessaire. Pour cela, on ajoute à 10 cc. de la solution de tanin trois gouttes de réactif B à 2,5 gr. %. La solution se colore très nettement en jaune brun. On dilue ensuite cette solution avec de l'eau distillée suivant les besoins de l'épreuve colorimétrique. Le réactif est toujours introduit dans la solution de tanin non diluée, jamais dans la solution ayant déjà été additionnée d'eau.

4° *Purification des liquides à analyser :*

Défécant A. P.

Acétate neutre de plomb.....	100 gr.
Acide acétique glacial.....	120 cc.
Eau distillée	600 cc.

On ramène le pH à 3,5 avec la solution tampon et on complète au litre avec de l'eau distillée.

Solution tampon pH 3,5

Acétate de sodium	100 gr.
Acide acétique glacial	350 cc.
Eau distillée	350 cc.

On ajuste le pH de la solution à 3,5 et on complète au litre avec de l'eau distillée.

Les solutions que l'on traite au réactif B doivent être limpides. A 5 cc. du liquide à examiner, on ajoute 2,5 cc. de défécant A. P., et après deux minutes 2,5 cc. d'acide sulfurique à 2,5 % volumétrique. On attend une minute puis on filtre et on procède à l'épreuve colorimétrique.

L'acidité du milieu n'influe pas sur la réaction violette, mais favorise la précipitation de l'acide urique. En effet, comme l'avaient constaté VON EULER et BURSTRÖM [106], ce composé provoquait des erreurs importantes que la nouvelle technique de BEZSSONOFF et WOLOSZYN [625] a permis d'éliminer.

5° *Dosage.* — De la lecture colorimétrique on déduit la valeur en U. C., ce qui donne la concentration en acide ascorbique du liquide examiné.

Méthode de Grace Medes

La méthode de GRACE MEDES [621], modifiée par SHINOHARA et PADIS [628], s'applique à la détermination de l'acide ascorbique réduit et oxydé reversiblement dans l'urine en présence de substances interférentes.

Elle est basée sur la réduction du réactif phosphotungstique de Folin. En effet, si l'on effectue la réaction en milieu acide, aucune des autres substances réductrices de l'urine, sauf les dérivés sulfurés, n'entre en jeu, et l'action de ces dérivés sulfurés peut être inhibée par l'addition de formol ou de sels mercuriques. La méthode peut donc se résumer ainsi :

a) En milieu tamponné au moyen du réactif phosphotungstique, on dose colorimétriquement la somme acide ascorbique réduit + cystéine.

b) On traite l'urine par le formol qui inhibe l'action de la

cystéine, et on fait un second dosage qui permet d'évaluer la cystéine.

c) Par action du bisulfite de soude sur une autre partie de l'urine, on réduit la cystine en cystéine. On détermine ainsi la somme acide ascorbique réduit + cystéine + cystine. On traite une autre portion de l'urine par le bisulfite de soude puis par le chlorure mercurique, qui précipite la cystéine préexistante et la cystéine provenant de la réduction de la cystine par le bisulfite, ce qui permet d'apprécier la somme cystéine + cystine.

Dès lors, il est facile d'en déduire la valeur de l'acide ascorbique réduit.

Méthode de Laporta

Laporta ([629]) utilise la coloration bleue que donne à la température de 50° la réduction du réactif 1 phospho 18 tungstique de Folin par la vitamine C.

Voici la technique sommaire proposée par Wachholder et Podesta ([105]).

On mélange 8 cc. de l'extrait sulfosalicylique avec 5 cc. de réactif de Folin exempt de molybdène et obtenu avec du tungstate de sodium rigoureusement pur.

On chauffe au bain-marie à 50° pendant une demi-heure. On filtre et on établit ensuite le coefficient d'extinction avec le colorimètre photoélectrique de Lang.

Cette méthode permet de déceler 0,2 mgr. d'acide ascorbique pour 100 cc. Toutefois, la proportionalité n'est rigoureuse que si l'on ne dépasse pas la concentration de 1,5 mgr. pour 100 cc. Quand le milieu est trouble, avant de mettre le réactif de Folin, on agite le mélange avec 0,75 cc. de sulfate d'ammonium par cc. de filtrat.

D'après Laporta, le réactif ne donne pas de réaction colorée avec les tanins, les aldéhydes, etc. (sauf avec la réductone), si l'on opère à un pH inférieur à 2.

Méthode de Fujita, Iwatake et Miyata

Principe. — Kotake et Nishigaki ([225]) ont montré que l'acide ascorbique en solution donnait avec le réactif sulfotungstique de Folin, après addition de soude, une coloration

bleue. Fujita et ses collaborateurs (624) (*) ont utilisé cette réaction pour faire un dosage colorimétrique de la vitamine C.

Réactifs. — a) On dissout en l'agitant au bain-marie 2 gr. de tungstate de sodium dans 10 cc. d'acide sulfurique N. Quand la dissolution est complète, on refroidit rapidement et on filtre. Le filtrat légèrement jaune doit être limpide, sinon il faut le clarifier par chauffage. Ce réactif doit être préparé *chaque jour*.

b) Solution de soude 2 N.

Technique. — Les auteurs se servent de l'acide métaphosphorique pour extraire la vitamine C, car cet acide s'oppose davantage à l'oxydation du facteur antiscorbutique que l'acide trichloracétique.

a) On prend 4 cc. de la solution à analyser qui contient la vitamine C dans 2 % d'acide métaphosphorique.

b) On verse 1 cc. du réactif tungstique, on mélange puis on ajoute 0,4 cc. de soude 2 N, et on agite soigneusement.

On obtient une coloration bleu ciel que l'on compare en lumière monochromatique jaune avec une solution étalon traitée de la même façon.

La réaction, qui est très sensible, permet de déceler 0,1 mgr. d'acide ascorbique par 100 cc. Toutefois, pour avoir un dosage précis, la concentration en acide ascorbique doit être comprise entre 0,5 mgr. et 10 mgr. pour 100 cc. Il faut, en outre, que le rapport de concentration entre la solution étalon et la solution à doser soit compris entre 1/2 et 2.

Technique de Ferrand. — Faisant l'étude critique de cette méthode, Ferrand (119) lui apporte deux modifications importantes :

a) L'acide métaphosphorique se conservant mal en solution aqueuse, on le remplace par de l'acide métaphosphorique produit extemporanément au contact d'une solution de PO_3 Na et SO_4 H_2. Pour le dosage, on conserve la concentration finale de 2 %.

b) Le dosage colorimétrique se révèle difficile dans les milieux biologiques végétaux souvent troubles, opalescents et pigmentés même après défécation. On lui substitue un

(*) A. Fujita, D. Iwatake et T. Myata, *Biochem. Ztschr.*, 1935, 277, p. 296.

dosage volumétrique en décolorant les sels bleus obtenus par le ferricyanure de potassium en milieu alcalin. Le passage de la teinte bleue ou bleu verdâtre à l'incolore ou au jaune faible permet de saisir le terme de la réaction.

En plus des réactifs employés dans la méthode de FUJITA, il faut donc une :

Solution de ferricyanure de potassium. — On prépare une solution mère en dissolvant 2 gr. de ferricyanure de potassium et 2 gr. de potasse pure dans 100 cc. d'eau distillée. Au moment de l'emploi on étend cette solution au 1/100e. La solution finale doit être étalonnée au moyen d'une solution standard d'acide ascorbique à chaque préparation.

DOSAGE. — Dans un Erlenmeyer de 15 cc. on met 2 cc. de la solution à doser, puis on ajoute 0,5 cc. de réactif sulfotungstique. On mélange et on ajoute 0,4 cc. de soude 2 N. On agite et on titre au ferricyanure jusqu'à décoloration.

Considérations. — De son étude critique sur la méthode de FUJITA, FERRAND a pu tirer les conclusions suivantes :

a) La méthode est exacte pour des solutions pures ou des liquides biologiques simples comme le jus de citron.

b) De nombreux composés réducteurs (tanin, pyrocatéchine, résorcine, hydroquinol, adrénaline, phloroglucine, thymol, etc.) donnent une coloration analogue. Par conséquent, la méthode de FUJITA, IWATAKE et MIYATA ne permet pas un dosage spécifique de la vitamine C, à moins d'opérer sur des extraits rigoureusement purifiés et débarrassés des substances interférentes.

III — MÉTHODES BASÉES SUR LA RÉDUCTION DU 2-6 DICHLOROPHÉNOL INDOPHÉNOL

Méthode de Tillmans

PRINCIPE. — La méthode de TILLMANS [8] (*) utilise un indicateur d'oxydo-réduction, le 2-6 dichlorophénol indophénol, qui est bleu en solution neutre ou alcaline et rouge en solution acide. Ce réactif oxyde quantitativement l'acide ascorbique en le transformant en acide déhydroascorbique, tandis

(*) J. TILLMANS, *Ztschr. für Untersuch. der Lebensmitt*, 1930, 60, p. 34. J. TILLMANS et P. HIRSCH, *Ztschr. für Untersuch. der Lebensmitt*, 1932, 63, p. 1 et 1933, 65, p. 145.

qu'il passe lui-même à la forme de leucobase phénolique incolore suivant la réaction :

$$CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH\text{-}COH{=}COH\text{-}CO{+}O{=}C_6H_2Cl_2{=}N\text{-}C_6H_4\text{-}OH \rightarrow$$
$$CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH\text{-}CO\text{-}CO\text{-}CO + HO\text{-}C_6H_2Cl_2\text{-}NH\text{-}C_6H_4\text{-}OH$$

Réactifs. — Le réactif est généralement utilisé sous forme d'une solution N/1.000 que l'on prépare de la façon suivante :

2-6 dichlorophénol-indophénol	26,8	mgr.
PO_4HNa_2 N/15	5	cc.
PO_4H_2K N/15	5	cc.
Eau distillée Q.S. pour.....	100	cc.

On délaie l'indicateur dans 10 cc. d'eau distillée. On centrifuge et on décante dans un ballon jaugé, puis on reprend le résidu par l'eau. On centrifuge de nouveau et on continue ainsi jusqu'à dissolution complète. On ajoute alors les solutions de phosphates, et on complète à 100 cc. avec de l'eau distillée.

Le pH de la solution ainsi obtenue est environ 7,2. Il est nécessaire de la conserver en flacon brun et de la titrer avant l'emploi avec une solution étalon d'acide ascorbique.

Extraction de la vitamine C. — Tillmans extrait l'acide ascorbique par une ébullition en milieu sulfurique sous atmosphère d'azote.

Dosage. — L'extractum étant amené au voisinage de la neutralité (pH $\geqslant$ 5,2), on verse l'indicateur jusqu'à coloration bleue persistante.

Le virage est assez difficile à apprécier.

Critiques et modifications de la technique

La méthode de Tillmans n'est pas absolument spécifique de l'acide ascorbique, car le réactif est également réduit par d'autres substances qui se trouvent dans les milieux biologiques, et notamment les composés sulfurés : glutathion, cystéine, ergothionéine, etc. Aussi de nombreux auteurs tentèrent-ils de la modifier pour en augmenter la spécificité.

Harris et Ray [134] font une extraction par l'acide trichloracétique. Ils effectuent ensuite leur dosage en versant l'ex-

tractum nettement acide (pH < 2,5) sur la solution d'indophénol jusqu'à décoloration du réactif. Le dosage doit être fini en moins de deux minutes.

Dans ces conditions, le glutathion n'interviendrait pas. Toutefois, la réductone, la cystéine et l'ergothionéine conservent encore un pouvoir de décoloration appréciable vis à vis de l'indicateur.

Bessey et King [138] opèrent d'une façon sensiblement analogue, mais en versant le réactif dans l'extractum acide à pH 2,0 environ.

Yavorsky, Almaden et King [629] procèdent comme Bessey et King, mais ils précisent que le dosage doit s'effectuer en dix secondes environ.

Emmerie et van Eekelen [630] ont proposé de purifier l'extrait trichloracétique en le neutralisant par du carbonate de calcium, puis en le traitant par l'acétate mercurique, qui enlève les composés sulfurés. En faisant passer un courant d'hydrogène sulfuré, on précipite l'excès de sel mercurique et on régénère l'acide ascorbique oxydé au moment de la défécation. On chasse l'hydrogène sulfuré au moyen d'un courant d'azote. On ramène l'extractum à pH 3,0 au moyen d'une solution d'acide trichloracétique à 10 % et l'on procède au dosage.

Dewjatnin et Doroschenko [631] font une extraction en milieu acétique à 5 % dans un courant de gaz carbonique. Ils neutralisent à pH 5,0 par du carbonate de chaux et ils font une défécation au moyen de l'acétate neutre de plomb. Avant le dosage, ils ramènent l'extractum à pH 3,0 par de l'acide acétique concentré.

Bukin [634] préconise un procédé analogue à celui d'Emmerie et van Eekelen. On fait une extraction des tissus au moyen de l'acide chlorhydrique à 2 %, et on déféque avec un mélange de chlorure et d'acétate mercurique. On associe ces deux sels, car l'acétate ne possède pas toujours son action précipitante, et le chlorure seul n'élimine pas complètement la cystéine, les tanins et les pigments. On traite ensuite par l'hydrogène sulfuré, puis par un courant de gaz carbonique. On doit alors effectuer le dosage en moins de deux minutes.

Manceau, Policard et Ferrand [119], [635] précisent également la technique de Emmerie et van Eekelen, et conseillent d'opérer de la façon suivante (pour l'urine) :

Dans un tube à centrifuger de 120 cc. on met 25 cc. d'urine

exactement mesurés à la pipette. On ajoute 12,5 cc. d'acide trichloracétique à 20 %. L'acide est ensuite neutralisé par un excès de carbonate de calcium (3 gr. environ). On agite de manière à laisser partir l'excès de gaz carbonique, puis on ajoute peu à peu, sans cesser d'agiter, 10 cc. d'une solution d'acétate mercurique à 20 %. On centrifuge durant deux minutes pour séparer le précipité et on décante le liquide surnageant dans un autre tube. On reprend le culot par 10 cc. d'eau distillée et on centrifuge à grande vitesse. On réunit les liquides et on les soumet durant une heure à l'action d'un courant d'hydrogène sulfuré. Il ne doit pas s'écouler plus de cinq minutes entre l'instant où l'acétate mercurique est ajouté et celui où les premières bulles de SH_2 passent dans le liquide après centrifugation.

On sépare le précipité de sulfure par centrifugation et on le lave avec 10 cc. d'eau. On réunit les liquides et on chasse l'excès de SH_2 par un fort courant d'azote pur. Il est indispensable de vérifier l'absence de SH_2 (test au nitroprussiate, papier à l'acétate de plomb, etc.), qui gênerait la réaction.

On complète le volume à 100 cc. avec de l'eau distillée et on ramène le pH à 1,2 par addition d'acide trichoracétique à 20 %.

On opère sur des prises d'essai de 5 ou 10 cc. en versant l'indicateur au moyen d'une microburette au 1/100e, jusqu'à obtention d'une teinte rose persistant plus de deux minutes.

Les résultats ainsi obtenus sont assez exacts, à condition que la concentration de l'extrait avant la défécation mercurique ne soit pas supérieur à 4 mgr. d'acide ascorbique pour 100 cc. Toutefois, cette technique est longue et risque d'occasionner des pertes par oxydation et par adsorption sur le précipité mercurique. Enfin, il est logique d'admettre que, dans les milieux biologiques complexes, des substances réductrices sont susceptibles de prendre naissance sous l'influence du traitement par SH_2 et de provoquer ainsi des erreurs.

Strohecker et Vaubel (633) pensent qu'il y a lieu de faire deux titrages, l'un à pH 5,2 (forme bleue de l'indicateur) et l'autre à pH 4,2 (forme rouge). Les résultats doivent concorder.

Ahmad (137) fait une extraction trichloracétique, mais il estime qu'il faut se trouver dans certaines conditions pour obtenir de bons résultats.

a) l'extractum doit avoir une teneur en acide ascorbique supérieure à 2 mgr. pour 1.000 cc.

b) la concentration en acide trichloracétique doit être inférieure à 5 %.

c) verser l'extractum sur une quantité connue de colorant.

d) effectuer le dosage en moins de deux minutes.

Mack et Tressler (632) opèrent l'extraction au moyen d'un acide fortement ionisé $SO_4 H_2$ à 8 %). De la sorte, les composés interférents ne gênent plus et l'oxydation à l'air est évitée, surtout si l'on a soin d'ajouter 2 % d'acide métaphosphorique. Ce procédé évite ainsi les inconvénients du traitement par l'hydrogène sulfuré.

Falke (650) utilise une simple titration à l'indophénol sur le liquide de centrifugation du plasma oxalaté, précipité par l'acide trichloracétique et métaphosphorique.

Ces diverses techniques présentent donc des avantages incontestables sur la méthode originale de Tillmans :

a) le glutathion ne gêne pas si l'on opère en milieu suffisamment acide, puisqu'il ne réduit pas l'indophénol à pH $< 2,5$.

b) la cystéine peut être éliminée par la défécation mercurique.

Par contre, un grave inconvénient résulte de la destruction du colorant par les milieux acides. Si l'on opère à un pH voisin de 2, cette décomposition peut fournir des chiffres beaucoup trop élevés, surtout dans le cas de produits pauvres en vitamine C.

Méthode de Meunier

Meunier (59), (201) a considérablement perfectionné la technique de Tillmans en étudiant la vitesse de décoloration de l'indophénol à un pH où il ne se détruit pas spontanément (pH 3, 8 à 4,2).

Principe. — Wurmser et de Loureiro (56), (74), ainsi que Borsook et ses collaborateurs (57), avaient déjà montré que l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par l'iode, l'indophénol, etc., était d'autant plus rapide que le pH était plus bas.

Meunier ainsi que Mindlin et Butler (636) ont constaté que la réduction de l'indophénol par l'acide ascorbique est très rapide par rapport aux autres réducteurs tissulaires, et notamment la cystéine et le glutathion.

Quand on opère à un pH 3, 8, l'acide ascorbique est la seule substance, dans les milieux biologiques, dont l'oxydation par l'indophénol est terminée en quinze secondes.

En étudiant avec son électrophotomètre la vitesse de décoloration d'une solution d'indophénol par une solution d'acide ascorbique (pH 3, 8), Meunier a remarqué que la courbe de décoloration en fonction du temps présentait un point anguleux très net à la quinzième seconde. Il a retrouvé ce même phénomène en ajoutant des substances réductrices (glutathion, cystéine, etc.). En prolongeant les parties de ces courbes, il a constaté que l'axe des ordonnées était coupé très sensiblement au même point dans les différentes solutions. Ainsi, on peut doser exactement l'acide ascorbique dans les milieux biologiques malgré la présence de substances interférentes.

Voici la technique sommaire de la méthode de Meunier (*).

Technique. — On utilise l'électrophotomètre de Meunier (Jobin et Yvon), qui permet des mesures rapides sur de petites quantités de liquide, tout en assurant une précision de 0,5 % environ.

On verse dans une cuve de 10 mm. d'épaisseur, parfaitement sèche, 5 cc. de la solution à doser. On mesure l'absorption due à cette liqueur dans la couleur désirée (écran jaune pour la forme bleue du colorant, en milieu neutre, ou écran vert pour sa forme rouge, en milieu acide). Cette première mesure donne l'absorption de base. On ajoute, à un instant bien déterminé, un volume exactement mesuré de solution à 0,1 pour 1.000 de colorant (solution faite dans de l'eau distillée fraîchement bouillie) : 0,5 cc. ou 1 cc. suivant que l'on opère avec la forme bleue ou la forme rouge du colo-

---

(*) La technique très détaillée de cette méthode avec son application au dosage de la vitamine C dans les différents milieux biologiques est exposée dans :

P. Meunier, *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, pp. 113 et 877.
R. Mindlin et A. Butler, *Jour. Biol. Chem.*, 1938, 122, p. 673.
A. Vinet, *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1941, 23, p. 354.
P. Meunier et Y. Raoul, *Diagnostic chimique des avitaminoses*, 1 volume, Masson et Cie, éd., Paris, 1942.

rant. On agite la cuve par retournement deux fois, et l'on se dispose à faire la lecture à la quinzième seconde qui suit l'addition du colorant. On fait ensuite de nouvelles mesures aux instants voulus, la cuve restant en place. Pratiquement on opère de quinze en quinze secondes pendant la première minute, et demi-minute en demi-minute ensuite. Les résultats se représentent en portant en abcisses le temps t et en ordonnées les divisions n de l'appareil.

Afin de préciser cet aperçu, nous exposerons, selon la technique de Mlle Vinet (637), quelques applications de la méthode de Meunier.

Dosage de la vitamine C dans le sang

a) Réactifs

Huile de vaseline
Oxalate de sodium pulvérisé

Solution A

Acide trichloracétique	14 gr.
Acide métaphosphorique	2 gr.
Eau distillée Q. S. pour	100 cc.

Solution B

Acide acétique N	200 cc.
Acétate de sodium à 136 gr. par litre	40 cc.
Lessive de soude à 30 %	60 cc.

Solution C

2-6 dichlorophénol-indophénol	5 mgr.
Solution tampon pH 7,1	1 cc.
Eau distillée Q. S. pour	50 cc.

Solution tampon à pH 7,1

Solution M/5 de PO_4H_2K	50 cc.
Solution M/5 de NaOH	32 cc.
Eau distillée Q. S. pour	200 cc.

On utilise l'électrophotomètre de Meunier avec écran vert.

b) Technique. — On recueille 5 cc. de sang sur oxalate et sous 3 cc. d'huile de vaseline. On centrifuge durant cinq minutes (4.000 tours/minute) et on prélève le plasma qui *doit être analysé le plus rapidement possible.*

Dans un tube à centrifuger on mélange 2 cc. de plasma et 2 cc. de solution A. On agite et on centrifuge.

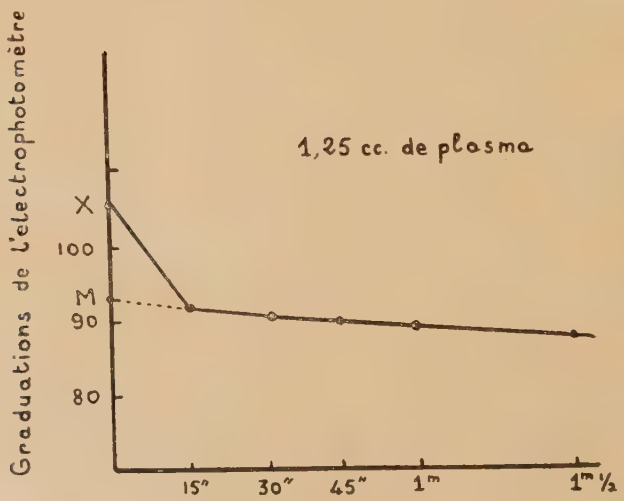
Dans la cuve propre et sèche de l'électrophotomètre on verse 2,5 cc. de liquide surnageant, limpide et incolore (ce qui correspond à 1,25 cc. de plasma).

On ajoute 2,5 cc. de solution B. On agite légèrement et on prend l'absorption lumineuse, soit n cette absorption dite de base.

A un instant bien déterminé (départ du chronomètre), on verse 1 cc. de solution d'indophénol. On agite en retournant la cuve une fois. On fait une lecture colorimétrique de quinze en quinze secondes pendant la première minute, puis de demi-minute en demi-minute jusqu'à la deuxième minute.

c) Etalonnage du colorant. — Dans la cuve lavée et séchée, on mélange 2,5 cc. de solution A diluée au demi et 2,5 cc. de solution B. On mesure l'absorption, soit n_0. On ajoute 1 cc. de solution C (colorant) et on prend son absorption, soit N. Cette valeur doit se conserver après une ou deux minutes, car une chute progressive de l'absorption indiquerait que le pH du mélange est notablement inférieur à 3,8.

d) Calcul. — On construit la courbe cinétique de la décoloration de l'indophénol par la solution plasmatique (fig. 1).



(I)

On extrapole cette courbe jusqu'à l'axe des ordonnées qu'elle vient ainsi couper au point M.

On calcule l'ordonnée à l'origine X de la courbe de décoloration. Pour cela, on fait la différence $(n - n_0)$, excès de l'absorption de base sur l'absorption de la solution tampon pure (pH 4,0).

On multiplie cette différence par 5/6 (cette réduction de la différence d'opacité correspond à la dilution de 5 à 6 cc. par addition de 1 cc. de colorant à 5 cc. de mélange à pH 4,0).

La somme de cette différence ainsi réduite et de N, valeur de l'absorption du colorant dans la solution tampon seule sous la même dilution, fournit X.

On a donc

$$X = N + (n - n_0) \frac{5}{6}$$

La quantité d'acide ascorbique de la prise d'essai est égale au produit de la différence (X — M), exprimée en divisions de l'appareil par la valeur d'étalonnage d'une division de l'appareil, par exemple 0,44 γ. (L'étalonnage de l'appareil sera décrit plus bas).

Comme la prise d'essai est toujours 1,25 cc. de plasma, la teneur en mgr. d'acide ascorbique par litre de plasma est donc fournie par l'expression :

$(X - M) \times 0{,}44 \times 0{,}8$ dans laquelle $X = N + (n - n_0) \frac{5}{6}$

M est lu sur le graphique, N, n et n_0 sur l'appareil

e) Exemple. — Une expérience a donné M = 93 avec une solution d'indophénol fournissant pour N la valeur 103.

On avait trouvé n = 15 et n_0 = 12.

Donc $n - n_0 = 3$ d'où $X = 103 + 2{,}5 = 105{,}5$

$$X - M = 105{,}5 - 93 = 12{,}5$$

Le plasma contient donc :

$12{,}5 \times 0{,}44 \times 0{,}8 = 4{,}4$ γ d'acide ascorbique par cc., soit 4,4 mgr. par litre.

Dosage de la vitamine C dans l'urine

a) Réactifs

Solution A tampon à pH 4,0

Solution normale (60 gr. par litre) d'acide acétique, 5 volumes
Solution normale d'acétate de sodium
(à 136 gr. par litre de sel cristallisé à 3 H_2 O).. 1 volume

Solution C de colorant (cf. dosage dans le sang)

b) Récolte et conservation de l'urine. — L'acide ascorbique étant rapidement détruit dans l'urine, il est nécessaire d'assurer sa conservation afin de pouvoir le doser.

Musulin et King (638) préconisent d'ajouter à l'urine dès son émission 6 % d'acide acétique et 2 % d'acide métaphosphorique.

Codvelle, Simonet et Mornard (349) conseillent d'ajouter simplement 3 % d'acide chlorhydrique pur.

Ce dernier procédé, très simple, est excellent.

c) Etalonnage du colorant. — On verse 5 cc. de solution A dans la cuve propre et sèche. On en mesure l'absorption dans le vert, soit n_0.

On verse 1 cc. de la solution C (indophénol). On agite la cuve en la retournant une fois et on note son absorption, soit N.

d) Dosage. — Dans une fiole jaugée on verse 1 cc. d'urine acidifiée par addition convenable de solution A et on étend à 10 cc.

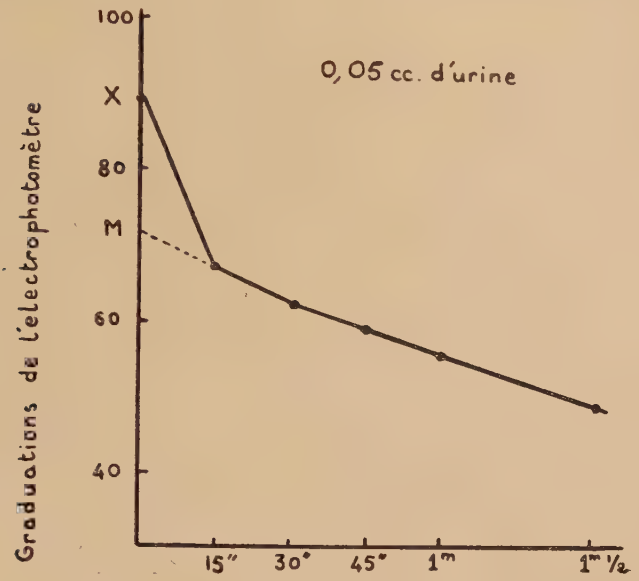
On verse 5 cc. de ce mélange dans la cuve et on mesure son absorption de base, soit n.

A un instant bien déterminé (départ du chronomètre), on verse 1 cc. d'indophénol. On agite en retournant la cuve une fois et on fait les lectures colorimétriques à partir de la quinzième seconde (comme pour le sang) jusqu'à la troisième minute.

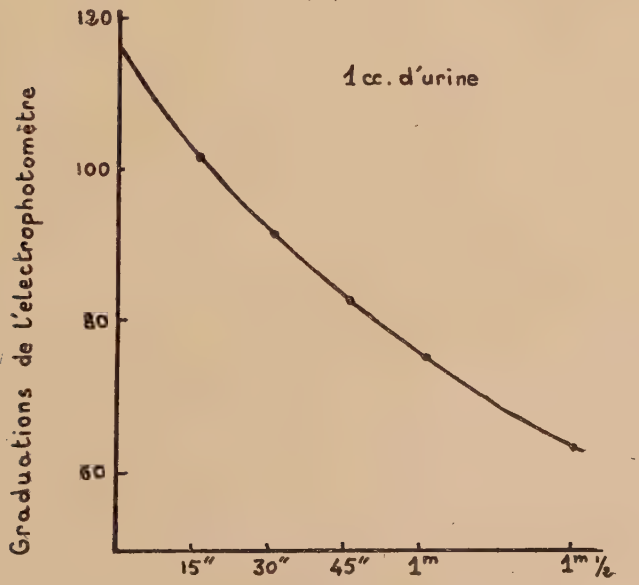
Si dès la première lecture, on constatait une décoloration complète du mélange, il faudrait recommencer le dosage sur une quantité plus faible d'urine. On pourrait ainsi descendre jusqu'à 0,10 cc. d'urine dans 10 cc. de solution A, ce qui correspond alors à 0,05 cc. d'urine.

e) Calcul. — Comme pour le cas du sang, on construit la

courbe cinétique de décoloration de l'indophénol, et on l'extrapole jusqu'à l'axe des ordonnées qui est ainsi coupé en M (fig. 2).



(II)



(III)

On calcule l'ordonnée à l'origine X de la courbe de décoloration, qui est fournie par

$$X = N + (n - n_0) \frac{5}{c}$$

La quantité d'acide ascorbique de la prise d'essai est alors donnée par le produit (X — M) × 0,44, ce dernier facteur étant la valeur d'une division de l'appareil en acide ascorbique.

On remarquera que ce dosage n'est possible que si la courbe cinétique de décoloration présente un point anguleux à la quinzième seconde. Ainsi, dans le cas de la figure 3, on ne pourrait pas affirmer la présence d'acide ascorbique dans la prise d'essai.

C'est donc un des avantages essentiels du procédé cinétique que de montrer ainsi les cas douteux pour lesquels tout chiffre fourni par les méthodes ordinaires à l'indophénol serait illusoire.

f) Etalonnage de l'appareil. — On l'effectue à partir d'une solution de 5 mgr. d'acide ascorbique dans 50 cc. d'acide chlorhydrique à 3 %. On prélève 0,5 cc. de cette solution et on l'amène à 10 cc. au moyen de la solution A. On opère exactement comme pour l'étalonnage du colorant sur 5 cc. de cette dernière dilution qui renferme 25 γ d'acide ascorbique.

La courbe cinétique obtenue forme, à partir de quinze secondes, un palier dont le prolongement fournit le point M. Quant à X, il se confond dans ce cas avec N, la solution de vitamine C ayant la même absorption que le tampon A.

Une division de l'appareil représente donc finalement :

$$\frac{25}{N - M} \ \gamma \text{ d'acide ascorbique}$$

Considérations. — Le procédé de Meunier présente donc de nombreux avantages. D'une part, il permet de doser l'acide ascorbique en présence des substances interférentes qui se trouvent dans les milieux biologiques complexes et, d'autre part, il évite ainsi les longs traitements (précipitations mercurique, hydrogène sulfuré, etc.), qui risquent de retenir une partie de la vitamine C.

Cette méthode est donc à la fois spécifique, rapide et précise. C'est, à l'heure actuelle, l'une des techniques les plus utilisées.

IV — Méthodes basées sur la réduction photochimique du bleu de méthylène

Méthode de Martini et Bonsignore

Principe. — La méthode de Martini et Bonsignore (639) (*) repose sur le fait que si l'on expose l'acide ascorbique à une lumière intense, son potentiel d'oxydo-réduction se déplace, en particulier, en présence de substances photodynamiques, vers les valeurs négatives. C'est ainsi qu'une solution de bleu de méthylène soumise à un rayonnement intense est rapidement réduite et transformée en sa leucobase incolore sous l'action de l'acide ascorbique.

Réactifs

A — Solution tampon

Citrate de sodium.....	30 gr.
Bicarbonate de sodium.....	8 gr.
Eau distillée Q. S. pour.....	220 cc.

B — Solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 5 %

Cette solution a pour but de retarder la réoxydation spontanée au contact de l'air de la leucobase du bleu de méthylène. Son action décolorante sur le bleu de méthylène est insensible dans les conditions opératoires. On ne doit pas conserver ce réactif plus de 24 heures.

C — Solution aqueuse de bleu de méthylène à 1/10.000

Technique. — On broie le tissu avec du sable quartzique et l'on fait à plusieurs reprises une extraction avec de l'acide trichloracétique à 8 %, jusqu'à un volume déterminé.

On verse 5 cc. de l'extractum dans une éprouvette en verre incolore et on ajoute 2 cc. de la solution A, puis 1 cc. de la solution B.

Dans une éprouvette identique on met 5 cc. d'acide trichloracétique à 8 % et les autres réactifs en même quantité que précédemment.

Au moyen d'une microburette (1/100 de cc.) on ajoute dans les deux éprouvettes 0,20 cc. de la solution C, puis on

(*) E. Martini et A. Bonsignore, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1934, 9, p. 388, et *Biochem. Ztschr*, 1934, 273, p. 170.

expose à la lumière d'une lampe de 500 watts. En présence d'acide ascorbique, le bleu de méthylène se décolore. On verse alors dans la première éprouvette une quantité de bleu de méthylène suffisante pour que la coloration soit identique à celle de l'éprouvette témoin.

En multipliant le nombre de cc. de la solution de bleu de méthylène versés, par la valeur correspondante à 1 cc. d'une solution à 1 % d'acide ascorbique, on obtient la quantité de vitamine C contenue dans la prise d'essai.

En admettant que le bleu de méthylène et l'acide ascorbique réagissent molécule à molécule, 1 cc. de solution à 1/10.000 correspondrait à 0,047 mgr. d'acide ascorbique. Les auteurs ont trouvé empiriquement 0,044 à 0,050 mgr., ce qui est donc une valeur très voisine.

La méthode ne présente une proportionnalité exacte qu'à condition de ne pas dépasser dans le dosage 1,5 cc. de bleu de méthylène pour 5 cc. de prise d'essai. Au-dessus de cette limite les résultats sont entachés d'erreur, et il est nécessaire de recommencer le dosage sur une dilution plus forte du liquide.

Critiques

Neuweiller (640) a constaté que suivant le pH envisagé, les quantités de bleu de méthylène décolorées par la même quantité d'acide ascorbique sont différentes. Ainsi, du pH 4 jusqu'au pH 5 elle est sensiblement la même, mais après elle augmente considérablement jusqu'au pH 7. Par conséquent, la valeur du coefficient 0,047 mgr., proposée par Martini et Bonsignore, ne peut être considérée comme exacte à tous les pH.

Policard et Ferrand (119), (644), (647), précisent la critique de Neuweiller en montrant que les déterminations du pH doivent être faites non par la voie colorimétrique, mais par la voie potentiométrique, qui est beaucoup plus précise.

Wachholder et Podesta (645) estiment qu'il faut toujours opérer avec une source lumineuse d'intensité constante et connue, car, pour une même quantité d'acide ascorbique, la quantité de bleu de méthylène décolorée varie avec l'intensité du flux lumineux.

Wachholder et Hamel (646) prétendent que l'urine contient des substances autres que la vitamine C, qui sont susceptibles de décolorer le bleu de méthylène.

— Diverses remarques ont été faites également par WIDENBAUER (245), LUND et LIECK (641), ainsi que par AMMON et HINSBERG (642), (643).

Méthode de Mentzer et Vialard-Goudou

Toutes ces critiques ont été reprises et systématiquement étudiées par MENTZER et VIALARD-GOUDOU (94) (*) qui ont pu déterminer ainsi les conditions optima du mode opératoire.

a) Le pH doit être voisin de 5,8.

b) La température ne doit pas dépasser 20° pendant l'irradiation.

c) Les solutions trichloracétiques d'acide ascorbique étant d'autant plus rapidement oxydables, même à la lumière du jour, qu'elles sont plus diluées, il est nécessaire de préparer des extraits trichloracétiques d'organes aussi concentrés que possible, de les conserver à l'obscurité et de les doser rapidement.

d) Les radiations lumineuses sont d'autant plus efficaces pour la décoloration que leur longueur d'onde est plus grande. Pour le dosage, on obtient les meilleurs résultats avec la lumière blanche provenant d'une lampe de 300 watts.

e) L'acide ascorbique n'est pas autoxydable en solution pure et à un pH voisin de 1. Cependant l'oxygène atmosphérique dissout dans la solution trichloracétique peut provoquer parfois une diminution du titre en acide ascorbique pendant la préparation des extraits d'organes.

f) La concentration optima de l'acide ascorbique dans la solution à doser doit être telle que le volume du bleu de méthylène, décoloré par la prise d'essai, soit voisin de 1,4 cc.

En partant de ces observations, les auteurs ont mis au point la méthode de dosage suivante :

RÉACTIFS

A — Solution citratée

Citrate trisodique	30 gr.
Bicarbonate de soude.....	8 gr.
Eau bidistillée bouillie.....	200 cc.

(*) C. MENTZER et A. VIALARD-GOUDOU, *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 707.

B — Solution de thiosulfate de sodium officinal à 5 % dans de l'eau bidistillée bouillie.

Les solutions A et B doivent être renouvelées toutes les semaines.

C — Solution de bleu de méthylène à 1 pour 10.000 dans de l'eau bidistillée bouillie (se conserve indéfiniment).

D — Solution d'acide trichloracétique à 6,4 pour 100 dans de l'eau bidistillée bouillie. Cette solution doit être saturée par un courant d'azote avant chaque usage.

E — Solution d'acide ascorbique réduit préparée en dissolvant 0,100 gr. d'acide ascorbique dans 100 cc. de la solution D. Cette solution se conserve au maximum un jour à l'abri de l'air et de la lumière. Avant l'emploi, il est nécessaire d'en vérifier le titre à l'aide d'une solution d'iode N/200, sachant que 1 cc. d'iode N/200 correspond à 0,44 mgr. d'acide ascorbique réduit.

Technique. — On triture dans un mortier 5 gr. de tissus en présence de sable lavé et de solution D (acide trichloracétique à 6,4 %). Quand on a un volume total de 20 cc., on filtre ou mieux l'on centrifuge aussitôt, afin que la durée de l'opération n'excède pas cinq minutes. On ajoute alors aussi rapidement que possible un volume connu de ce liquide (0,10 cc. à 5 cc. suivant la concentration en acide ascorbique) à une solution tampon, contenue dans un tube à essai de 2 cm. de diamètre et préparée extemporanément par le mélange de 2 cc. de solution A, 1 cc. de solution B et un volume de solution D tel que le volume final soit de 8 cc.

A l'aide d'une microburette on verse dans le tube 0,20 cc. de solution de bleu de méthylène. On agite et l'on expose à la lumière blanche provenant d'une lampe de 300 watts.

Cette lampe est enfermée à l'intérieur d'une enceinte en bois ou en carton munie d'une fente rectangulaire par laquelle la lumière pénètre dans une deuxième enceinte, après avoir traversé un système réfrigérateur (courant d'eau continu).

La deuxième enceinte comprend, à sa partie supérieure, un orifice circulaire permettant l'introduction du tube à essai. On suit la décoloration du bleu en regardant dans l'axe du tube. Quand cette décoloration a atteint son maximum (ce qui, en général, ne demande pas plus de dix se-

condes), on retire le tube et l'on ajoute à nouveau 0,20 cc. de bleu de méthylène. On agite et l'on opère comme précédemment. On continue l'addition du colorant jusqu'à obtention, après une dernière exposition à la lumière, d'une coloration identique à celle d'un témoin préparé en ajoutant 0,20 cc. de bleu de méthylène à une quantité d'eau distillée telle que les volumes soient égaux dans les tubes.

Dans le cas où le liquide à doser est légèremnet coloré en jaune, ce qui est fréquent, on prépare le témoin en partant de 5 cc. de ce liquide auxquels on ajoute deux gouttes de perhydrol, 2 cc. de solution citratée, 1 cc. d'hyposulfite et 0,20 cc. de bleu de méthylène.

On obtient le nombre de centimètres cubes de bleu décoloré en déduisant les 0,20 cc. du témoin du nombre de cc. de colorant versés.

Pour avoir une précision maxima, la quantité de bleu décoloré doit être comprise entre 0,8 cc. et 1,4 cc. S'il n'en est pas ainsi, on modifie le volume de la prise d'essai de manière à obtenir un chiffre situé dans ces limites. En suivant ce mode opératoire, on titre la solution de bleu de méthylène par rapport à une solution fraîche d'acide ascorbique réduit à 1 pour 1.000 dans de l'acide trichloracétique à 6,4 %. Cette solution est diluée extemporanément au centième. Pour cela, on en verse 0,05 cc. dans un tube à essai contenant 4,95 cc. d'acide trichloracétique à 6,4 %, on ajoute rapidement 2 cc. de solution citratée, 1 cc. d'hyposulfite de soude et on titre le bleu de méthylène.

Soit n le nombre de cc. de bleu décoloré par la prise d'essai de la solution à doser, et n' le nombre de cc. décolorés par 0,05 cc. d'acide ascorbique à 1 pour 1.000. La quantité d'acide ascorbique réduit en mgr. contenu dans la prise d'essai sera donnée par la formule

$$X = \frac{0{,}05 \times n}{n'}$$

Ainsi appliquée, cette technique permet de déceler 0,04 mgr. d'acide ascorbique dans 5 gr. de tissus, mais des dosages corrects ne peuvent être effectués qu'à partir de concentrations cinq fois plus fortes (de l'ordre de 4 mgr. pour 100 gr. d'organes).

Les écarts obtenus dans ce cas entre deux dosages succes-

sifs peuvent être de 10 % au maximum. D'après les auteurs, l'erreur d'expérience ainsi commise peut être diminuée si l'on a soin de faire trois dosages sur le même extrait puis de prendre la moyenne des résultats obtenus.

Considérations. — La méthode au bleu de méthylène n'est pas influencée par la présence des dérivés sulfhydrylés. De plus, les autres substances renfermant le groupement ènediol et qui réagissent comme l'acide ascorbique vis-à-vis du bleu de méthylène n'ont pas été, jusqu'à présent, rencontrées dans les milieux biologiques. Il semble donc que ce procédé permette un dosage spécifique de la vitamine C.

Méthode de Zimmermann

Afin de rendre plus précise la méthode au bleu de méthylène, Wahren [648] puis Zimmermann [649] (*) ont utilisé un électrophotomètre.

Principe. — Un excédent du colorant est réduit partiellement par éclaircissement de la solution d'acide ascorbique. On mesure à l'aide d'un électrophotomètre la décroissance de l'extinction au cours de la réduction .Cette décroissance est proportionnelle à la teneur en vitamine C.

Technique. — On mélange dans des tubes à essai 1 cc. de solution de vitamine C (eau, sérum, urine, etc...) à pH 1,6 avec 4 cc. de solution de bleu de méthylène à 1 mgr. %. On verse dans une coupelle de 10 mm., on éclaicit la solution à titrer avec une lampe de 200 watts, puis on en mesure l'extinction au photomètre de Pulfrich. On mesure de la même façon l'extinction d'une solution témoin.

Dans ce procédé, ce n'est pas la quantité absolue de colorant et son extinction qui jouent, mais uniquement la différence des extinctions des quantités de bleu de méthylène colorées par la vitamine C.

On estime donc cette différence des extinctions (Eo — Ec) qui est proportionnelle à la teneur en vitamine. En la multipliant par un facteur donné suivant les conditions de recherche (acide trichloracétique, acide métaphosphorique, etc...) on obtient la quantité d'acide ascorbique en mgr. pour 100 de la solution étudiée.

(*) H. Wahren, *Klin. Woch*, 1937, 16, p. 1496.
W. Zimmernann, *Klin Woch*, 1938, 17, n° 49 (3 décembre 1938).

Considérations. — Nous n'avons exposé que très sommairement cette méthode. En effet, sa technique à la fois délicate et complexe ne semble pas lui permettre de rivaliser avantageusement avec celle que préconise Mentzer.

Méthode de Mentzer

La photoréduction du bleu de méthylène dépend très étroitement d'un grand nombre de facteurs extérieurs. Suivant les conditions expérimentales, elle est plus ou moins quantitative, c'est-à-dire que le nombre de molécules d'acide ascorbique qu'il faut pour décolorer la molécule de bleu de méthylène peut être plus ou moins élevé. Mentzer [319] (*) appelle ce nombre de molécules « coefficient d'équivalence ». Ce coefficient K est minimum et égal à 1 quand la photoréduction s'effectue dans les meilleures conditions, c'est-à-dire qu'une molécule de bleu de méthylène est décolorée par une molécule d'acide ascorbique.

Dans leur technique, Mentzer et Vialard-Goudou (cf. supra) ont déterminé les différents facteurs permettant d'opérer dans les conditions optima. Cependant, il y a un fait qui tend toujours à troubler l'exactitude du dosage, c'est la recoloration du leucobleu formé pendant la photoréduction.

Pour obtenir des résultats constants, Mentzer estime qu'il est indispensable d'éviter cette recoloration.

Croyant qu'elle était due à une réoxydation par l'oxygène atmosphérique, Martini et Bonsignore ajoutaient du thiosulfate de sodium afin de protéger le leucobleu. Toutefois, la protection ainsi obtenue est négligeable.

De son côté, Mentzer s'efforça d'éviter l'arrivée de l'oxygène en opérant sous huile de vaseline ou dans le vide, mais il ne put empêcher la recoloration. Il en conclut que celle-ci n'était pas due à l'action de l'air mais qu'elle provenait de la réaction reversible :

$$\text{leucobleu de méthylène} + \text{acide déhydroascorbique} \rightleftarrows \text{bleu de méthylène} + \text{acide ascorbique}$$

Cette réaction va de droite à gauche sous l'influence d'une lumière intense et de gauche à droite à l'obscurité ou en

(*) C. Mentzer, *Contribution à l'étude biochimique de l'acide ascorbique*, Thèse de Pharmacien Supérieur, Paris, 1940.

lumière diffuse. En effet, soumettant les tubes, recolorés à l'obscurité dans le vide, à une seconde irradiation, MENTZER a pu constater une deuxième décoloration.

Par conséquent, pour effectuer des dosages corrects d'acide ascorbique, il ne suffit pas simplement d'empêcher l'action de l'oxygène atmosphérique, mais il faut encore empêcher l'acide ascorbique de se reformer aux dépens du leucobleu.

Etudiant la réaction :

$$\text{acide déhydroascorbique} + \text{leucobleu de méthylène} \longrightarrow \text{acide ascorbique} + \text{bleu de méthylène}$$

MENTZER remarqua que celle-ci est d'autant plus lente que le pH est plus bas. A partir d'un pH voisin de 3,2, sa vitesse devient pratiquement nulle. Du bleu de méthylène décoloré dans ces conditions par l'acide ascorbique reste décoloré, mais si, à cet instant, on fait arriver du phosphate disodique dans la solution, l'élévation du pH a pour conséquence la recoloration immédiate du leucobleu, *même en l'absence d'oxygène libre.*

MENTZER a utilisé cette constatation pour mettre au point un dosage colorimétrique de l'acide ascorbique.

PRINCIPE. — On introduit le liquide à doser dans une cuve renfermant une solution tamponnée à pH 3. On ajoute un excès connu de bleu de méthylène, on irradie dans un courant de gaz carbonique et on évalue l'excès de colorant à l'aide d'un photomètre.

REMARQUE. — Le pH optimum est au voisinage de 3, et il faut éviter de descendre au-dessous. En effet, la vitesse de la photoréduction du bleu de méthylène par l'acide ascorbique diminue avec le pH ; à pH 3 cette vitesse est encore très grande, mais au-dessous elle diminue considérablement. D'autre part, le coefficient d'équivalence K, qui est égal à 1 pour le pH 3, passe à 2 pour le pH 2. C'est d'ailleurs là un des graves inconvénients de la méthode indiquée par WAHREN et ZIMMERMANN qui, opérant à pH < 2 n'obtiennent jamais de réduction quantitative.

TECHNIQUE. — On broie 5 gr. de tissu avec un poids égal de sulfate d'ammonium cristallisé pur. On épuise à deux reprises avec 10 cc. d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. On réunit les liquides d'extraction, on les amène à un volume déterminé (25 cc. par exemple), puis on filtre.

On effectue le dosage en partant d'une prise d'essai pouvant aller de 0,1 cc. à 1 cc., suivant la concentration en acide ascorbique.

Dans la cuve d'un photomètre à cellules photoélectriques, on introduit 5 cc. de solution tampon (pH 3,1), 1 cc. de solution de bleu de méthylène à 1/10.000 et 1 cc. de solution à doser. On soumet aussitôt le mélange ainsi obtenu à un dosage photométrique, soit n le nombre de divisions lues sur l'appareil. On expose ensuite la cuve à la lumière d'une lampe de 300 watts durant une minute exactement. Pendant cette irradiation, il est nécessaire de traiter la solution par un courant d'anhydride carbonique qui agite la masse. Le bleu de méthylène restant est aussitôt dosé au photomètre et on obtient ainsi un nombre de divisions n'.

Une courbe d'étalonnage préalablement établie permet de déterminer la teneur en acide ascorbique de la prise d'essai, en fonction de la différence n' — n. Ce dosage est donc très simple. Il suffit d'avoir un photomètre capable d'enregistrer des différences de teintes correspondant au minimum à 0,01 cc. de solution de bleu de méthylène à 1/10.000.

La solution tampon à pH 3,1 est ainsi composée :

Acide tartrique 0,1 N.....	3,33 cc.
Tartrate de sodium 0,1 N.....	1,66 cc.

En opérant à pH 3,1, la recoloration du leucobleu ne se fait que très lentement, de sorte qu'on peut disposer facilement d'une demi-minute pour effectuer la lecture après l'éclairement. Cette recoloration est un peu plus rapide avec certains milieux biologiques, mais elle ne constitue pas une cause d'erreur importante.

Enfin, en ce qui concerne la courbe d'étalonnage, MENTZER a constaté qu'il existe une proportionnalité entre la concentration en acide ascorbique et le bleu décoloré, tant qu'il ne s'est pas formé plus de 30 % de leucodérivé. Au-dessus de cette limite il n'y a plus de proportionnalité rigoureuse. Dans ce cas, il faut recommencer le dosage en diminuant la prise d'essai de la solution à doser.

DOSAGE DE LA FORME OXYDÉE DE L'ACIDE ASCORBIQUE. — L'acide déhydroascorbique, produit d'oxydation de l'acide ascorbique, a été mis en évidence dans certains tissus. Ce corps, qui est encore moins stable que l'acide ascorbique,

se détruit *in vitro* à un pH voisin de 7 en donnant des produits d'oxydation irréversibles et encore en partie indéterminés.

Le dosage de cette forme oxydé s'effectue de la façon suivante : On triture l'organe en présence d'acide trichloracétique à 20 %. Par addition de bicarbonate de sodium on amène le filtrat acide à un pH de 6,5, puis on le traite par un courant d'hydrogène sulfuré pendant vingt minutes. On chasse l'excès de SH_2 par un barbotage d'azote, puis on ajuste le pH à 3 au moyen d'une solution d'acide tartrique et l'on dose par la méthode habituelle.

Considérations. — En dehors des réducteurs puissants de la chimie minérale (chlorure stanneux, hydrosulfites, bisulfites, sulfures, etc.), les seules substances organiques connues ayant des propriétés réductrices analogues à l'acide ascorbique sont celles qui renferment le groupement ène-diol (réductone, acide réductique, etc.). Or, ces substances n'ont jamais été rencontrées chez les êtres vivants. Par conséquent, elles ne peuvent gêner le dosage de la vitamine C dans les milieux biologiques.

Toutefois, Polonowski et Degrez (651) ont constaté que la généserine était capable de réduire le bleu de méthylène par irradiation à pH 4,7. Reprenant ces expériences, Mentzer a pu établir que l'intensité de cette photoréduction diminuait considérablement en fonction du pH. A pH 3,1 et au-dessous, la décoloration du bleu de méthylène par la généserine est nulle. Comme on opère justement à pH 3,1, ce composé ne peut donc exercer aucune influence sur le dosage.

Toutes les autres substances essayées dans les mêmes conditions sur le bleu de méthylène : glutathion, cystéine, glucose, adrénaline, peptone pancréatique, hydroquinone, acide succinique, tryptophane, créatine, créatinine, acide urique, hypoxanthine, xanthine, guanine, adénine, urée, n'ont exercé aucune action réductrice sur ce colorant.

Enfin, les résultats obtenus par la méthode de Mentzer sont, en tous points, comparables à ceux que fournit la technique de Meunier. Ces deux procédés semblent être, par conséquent, les plus spécifiques et les plus exacts.

V. — Méthode basée sur la formation d'une hydrazone

Méthode d'Espil et Genevois

Comme l'ont montré Ohle et Bockmann (66) l'action de la phénylhydrazine et de ses dérivés sur l'acide ascorbique donne naissance à des hydrazones. Comme la formation de ces composés est quantitative, Espil et Genevois (200), (653) (*) ont utilisé cette propriété pour mettre au point une méthode de microdosage de la vitamine C.

Principe. — On précipite quantitativement l'acide ascorbique par la 2. 4 — dinitrophénylhydrazine en milieu chlorhydrique. La réaction se fait en 24 heures à 80° (temps nécessaire à l'oxydation en acide déhydroascorbique). On sépare des autres osazones ou hydrazones (comme celle de l'acide pyruvique) par dissolution dans le carbonate de sodium à pH 9, puis reprécipitation à pH 6. par un courant de gaz carbonique. L'hydrazone ainsi isolée sera évaluée pondéralement ou mieux volumétriquement à l'aide du trichlorure de titane, dont on titrera l'excès par une liqueur de sulfate ferrique en présence d'un sulfocyanure alcalin comme indicateur.

On peut également doser l'excès de trichlorure de titane au moyen d'une solution titrée d'un colorant de rH convenable, par exemple une solution de bleu de méthylène jusqu'à coloration bleue persistante.

Bien entendu, pour éviter l'oxydation du chlorure titaneux, il est indispensable d'effectuer toutes les opérations dans un récipient clos parcouru par un courant de gaz inerte.

Comme on emploie des liqueurs très diluées, il faut également tenir compte des impuretés réductibles amenées par le solvant et faire un dosage à blanc en présence de la même quantité d'alcool que celle qui est employée dans le dosage.

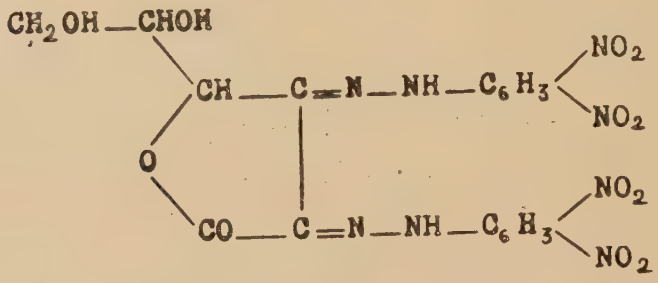
Le trichlorure de titane agit comme réducteur suivant l'équation :

$$Cl_3\,Ti + Cl\,H \longrightarrow Cl_4\,Ti + H$$

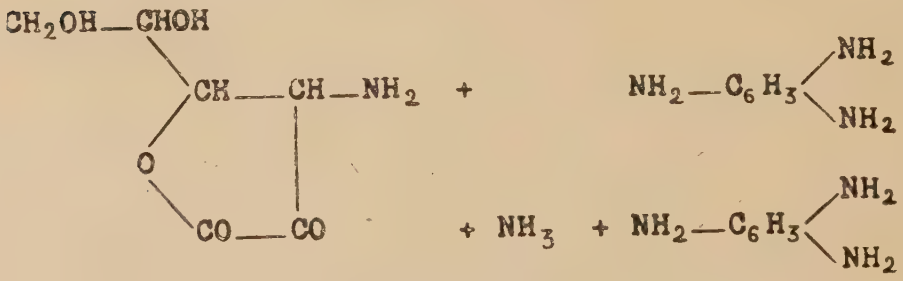
(*) L. Espil et L. Genevois, *Bull. Soc Chim. de France*, 1938, 5, pp. 17 et 1532.

Gatet, Mandillon et Espil, *Bull. Soc. Chim. de France*, 1939, 6, p. 1188.

D'autre part, deux molécules de dinitrophénylhydrazine se fixent sur une molécule d'acide déhydroascorbique pour donner le composé :



Enfin, on sait que la réduction des osazones est accompagnée d'une hydrolyse et que le produit résultant, pour le glucose par exemple, est l'isoglucosamine. Il semble donc logique d'admettre que, dans le cas de l'acide ascorbique, la réduction donne les produits suivants :



Cette réaction exige 32 atomes d'hydrogène, dont 30 sont apportés par le trichlorure de titane.

Technique. — On ajoute au liquide à doser un excès de solution de dinitro 2. 4 — phénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 2 N. La précipitation est instantanée si l'acide ascorbique se trouve sous sa forme oxydée, mais elle demande 24 heures à 80° s'il se trouve sous sa forme réduite.

Par centrifugation on sépare le précipité, qui est généralement un mélange d'hydrazones. On le lave avec une solution de carbonate de sodium N (pH 9), qui dissout le dérivé de la vitamine C.

On précipite celui-ci de sa solution, à pH 6, au moyen d'un courant de gaz carbonique. La précipitation est complète au bout de 24 heures.

On isole le précipité par centrifugation ou filtration. Le point de fusion de cette hydrazone est de 271°. On la redissout dans le méthanol de manière à obtenir une solution dont la concentration est de l'ordre de 5 à 10 mgr. pour 100 cc.

Les solutions de chlorure titaneux employées contiennent de 2 à 5 milliéquivalents de Cl_3 Ti dissouts dans de l'acide chlorhydrique 2 N. Elles sont conservées dans une burette automatique et sous pression de gaz carbonique. Toutes les manipulations doivent être effectuées sans aucun contact du liquide avec l'air.

On étalonne la solution par des dosages au sulfate ferrique et au dichloro 2. 6 — benzénone indophénol.

Dans un ballon parcouru par un courant de gaz carbonique, on verse 10 cc. de la solution méthylique d'hydrazone.

On ajoute alors un excès (50 cc.) de la solution titrée de chlorure titaneux (environ N/500) et on porte le ballon pendant une minute à une température de 60° — 70° sans interrompre le courant de gaz carbonique.

Par un tube prévu à cet effet, on ajoute 1 cc. de l'indicateur et on verse la solution ferrique jusqu'à coloration rose.

D'après l'équation indiquée précédemment, à 1 micromolécule de trichlorure de titane correspond un poids de 17,7 γ d'hydrazone représentant 5,8 γ d'acide ascorbique.

Considérations. — Cette méthode est certainement spécifique, mais elle est longue et compliquée, ce qui en réduit considérablement l'application pratique. Toutefois, elle peut constituer un excellent moyen de vérification et de contrôle.

METHODE DIASTASIQUE

Méthode de Tauber et Kleiner

Dans le but de doser l'acide ascorbique à l'exclusion des autres substances réductrices, Tauber et Kleiner [136] (*) emploient une oxydase isolée à partir du péricarpe de courge (curcurbita maxima) ou d'autres plantes. Cette diastase, nommée *ascorbinase*, serait capable d'oxyder spécifi-

(*) H. Tauber et I. Kleiner, *Journ. of. biol. Chem.*, 1935, 108, p. 563. 1935, 110, p. 1159.

quement l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique, sans attaquer les autres substances réductrices.

Cette propriété a été utilisée pour préciser les résultats trouvés par d'autres méthodes, en dosant par différence l'acide ascorbique avant et après l'oxydation par l'ascorbinase.

Admettons, par exemple, que l'on ait à doser l'acide ascorbique d'une urine. On déterminera tout d'abord au moyen de l'indophénol (ou d'une autre méthode) le pouvoir réducteur total de l'urine. On déterminera ensuite le même pouvoir réducteur sur un autre échantillon de l'urine préalablement additionné d'ascorbinase. La différence entre les deux résultats correspond à l'indophénol qu'il aurait fallu pour oxyder l'acide ascorbique seul.

Technique. — On prépare la solution d'ascorbinase extemporanément en agitant pendant cinq minutes un mélange de 50 gr. de pulpe de potiron rapé avec 150 cc. d'alcool à 30°. Comme le préconise Anceaux [232], on peut remplacer avantageusement l'alcool par de l'eau distillée, ce qui permet de réaliser les deux dosages en opérant dans des conditions rigoureusement identiques.

A 20 cc. de liquide à doser on ajoute 10 cc. d'une solution d'ascorbinase. On amène le pH à 5,4 (qui est le plus favorable à l'oxydation de la vitamine C) au moyen de 1 cc. d'une solution tampon d'acétate de sodium normale. On place le mélange à l'étuve à 37° durant une heure. Après action de l'oxydase, on défèque en ajoutant 1,5 cc. d'eau distillée et 7,5 cc. d'acide trichloracétique à 20 %. On filtre et on procède au dosage sur une quantité déterminée du filtrat.

Considérations. — Ce procédé semblerait assez intéressant, mais malheureusement la spécificité de l'oxydase n'est pas absolue. L'expérience a montré, en effet, que des substances réductrices autres que la vitamine C, le glutathion par exemple, peuvent également être oxydées par l'ascorbinase.

METHODES PHYSIQUES

Constatant le manque de spécificité des méthodes chimiques, quelques auteurs songèrent à employer des méthodes physiques dans l'espoir, sinon d'éliminer, du moins de réduire les causes d'erreur.

Ces procédés sont basés sur les propriétés spectrales de l'acide ascorbique, qui possède une absorption caractéristique dans l'ultra-violet à 2.650 Å en milieu neutre. Ce maximum se déplace vers les grandes longueurs d'onde au fur et à mesure que le pH augmente. Enfin, le spectre disparaît totalement quand on oxyde la double liaison par l'iode.

Dans les milieux biologiques complexes, le spectre d'absorption de l'acide ascorbique ne correspond pas à la valeur donnée par la titration chimique, en raison de l'existence de corps réducteurs autres que la vitamine C.

Il faut donc, dans une étude spectrographique, pouvoir mettre en évidence, d'une part, le spectre de l'acide ascorbique ou de corps analogues pouvant exister dans le milieu et, d'autre part, le spectre de corps non réducteurs mais doués d'absorption sélective.

Plaut, Bulow et Pruckner (184) avaient essayé de doser l'acide ascorbique contenu dans le sérum sanguin, le liquide céphalo-rachidien et le cerveau, mais les extraits ainsi examinés, encore très absorbants dans la région de 2.650 Å, interdisaient toute conclusion rigoureuse.

Cette question fut reprise par de Loureiro et finalement mise au point par Chevallier et Choron.

Méthode de J.-A. de Loureiro

De Loureiro (74) (*) a indiqué un procédé permettant de doser l'acide ascorbique dans des extraits de tissus débarrassés aussi complètement que possible des autres substances absorbantes dans l'ultra-violet.

Pour cela, il élimine les polypeptides au moyen de l'acide phosphotungstique, tandis que l'acétate mercurique permet d'éliminer les substances sulfurées et les autres corps absorbants.

A titre documentaire, nous résumerons brièvement le processus opératoire indiqué par l'auteur pour extraire l'acide ascorbique à partir du cerveau.

On soumet l'organe broyé à l'action d'un mélange d'eau et d'acétone pendant trois heures. On opère sous une atmos-

(*) J. A. de Loureiro, *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1936, 18, p. 757.

phère d'azote. On évapore le filtrat, on l'additionne de $SO_4 H_2$ N puis on le traite par l'acide phosphotungstique en milieu acide. On filtre et on élimine l'acide phosphotungstique par une solution de caséine.

On filtre et on neutralise l'acide sulfurique au moyen d'une suspension de carbonate de baryum.

On additionne le filtrat d'une solution d'acétate mercurique, à 20 % à pH 5,7 environ, puis on élimine l'acétate mercurique par un courant d'hydrogène sulfuré, ce qui permet de réduire l'acide ascorbique reversiblement oxydé.

Enfin on chasse l'hydrogène sulfuré par un courant d'azote ou d'hydrogène en présence d'acide chlorhydrique N.

Le filtrat contient, en plus des constituants des tissus restés en solution, du chlorure d'ammonium, un peu d'acide acétique et des traces de baryum, c'est-à-dire des corps non absorbants. La réaction au nitroprussiate est complètement négative, le titre à l'iode est égal au titre à l'indophénol et le spectre observé disparaît complètement quand on ajoute de l'iode à la solution.

Le filtrat ainsi obtenu est donc optiquement pur, ce qui permet un examen facile de son spectre d'absorption. Si l'on a pris soin de noter à chaque moment les volumes de liquide ajoutés, on sait quelle est la dilution de l'extrait final par rapport à l'organe. Il est donc possible, d'après l'intensité du spectre observé, de calculer la teneur de cet organe en vitamine C.

En tenant compte des causes d'erreurs provenant de la désalbumination (précipitation mercurique notamment), d'une part, et de la technique spectrographique, d'autre part, DE LOUREIRO estime que l'erreur probable est de ± 13 %.

CONSIDÉRATIONS. — Bien que spécifique, cette méthode présente de nombreux inconvénients. Elle exige une quantité d'organes relativement importante (300 gr. environ), sa technique est longue et délicate, enfin le résultat manque de précision.

Ce procédé, toutefois, est préférable à celui préconisé par ROBERTSON (627), qui effectuait un dosage spectrographique de l'acide ascorbique sur des extraits non purifiés, en estimant la différence entre le spectre total du tissu et celui qui reste après l'addition d'un oxydant. En effet, l'élimination de tous les corps absorbants dans l'ultra-violet est indispen-

sable pour permettre l'observation correcte du spectre de l'acide ascorbique dans les milieux biologiques.

Méthode de Chevallier et Choron

Chevallier et Choron (77) (*) ont mis au point une technique qui permet de doser spectrophotométriquement l'acide ascorbique à partir de très faibles quantités d'organes, de tissus ou de liquides biologiques.

Etudiant par spectrophotométrie les courbes d'absorption de l'acide ascorbique en fonction de divers facteurs, les auteurs ont pu faire les constations suivantes :

1° L'oxydation spontanée de l'acide ascorbique est inhibée par une très faible quantité (1/50.000) de cyanure de potassium ;

2° L'absorption de l'acide ascorbique diminue et même disparaît sous l'influence du rayonnement d'un tube à hydrogène ;

3° La réduction par l'hydrogène sulfuré permet de retrouver intégralement la courbe d'absorption initiale de l'acide ascorbique, sa disparition étant due soit à l'oxydation spontanée, soit à l'irradiation par un tube à hydrogène ;

4° La présence de cyanure de potassium n'influe pas sur le phénomène ;

5° Les mêmes faits ont été mis en évidence, mais avec une vitesse de réaction accélérée, lorsque la solution d'acide ascorbique est faite dans l'éthanol absolu (pH 5,5), avec ou sans la présence de cyanure de potassium.

En partant de ces observations, Chevallier et Choron indiquent une méthode qui permet de doser spectrophotométriquement l'acide ascorbique dans les milieux biologiques.

Principe. — On établit la courbe d'absorption dans l'ultraviolet de l'extractum alcoolique à doser. Cet extractum est ensuite irradié par un tube à hydrogène qui détruit l'acide ascorbique. A ce moment, on détermine à nouveau la courbe d'absorption spectrale. La différence entre ces deux courbes représente la courbe d'absorption donnée par l'acide ascorbique contenu dans le tissu. Une simple comparaison avec la courbe d'une solution titrée d'acide ascorbique pur permet

(*) A. Chevallier et Y. Choron, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, p. 743. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 510.

de déterminer la teneur en vitamine C de l'extractum.

Technique. — *Alcool cyanuré saturé d'hydrogène sulfuré.* On fait passer bulle à bulle un courant d'hydrogène sulfuré dans 20 cc. d'alcool absolu (pH 5,5). On y ajoute ensuite 0,4 cc. d'une solution aqueuse de cyanure de potassium à 1/200.

On broie 1 gr. de tissu avec 6 gr. de sulfate de sodium anhydre en présence de cet alcool cyanuré saturé d'hydrogène sulfuré. On maintient le mélange à 0° pendant une demi-heure et on filtre.

On prélève une partie aliquote du filtrat (2 cc. en général) et on évapore à 60° environ sous une atmosphère d'azote.

On reprend le résidu par 10 cc. d'une solution aqueuse de cyanure de potassium au 1/50.000 et l'on établit la courbe d'absorption dans l'ultra-violet, de 2.400 à 3.000 Å. Cette courbe, suivant la richesse du tissu en acide ascorbique, présente un maximum ou seulement une inflexion à 2.650 Å.

On irradie cette solution au moyen d'un tube à hydrogène et on observe une diminution de l'absorption dans cette région du spectre. On arrête l'irradiation lorsque la courbe d'absorption n'est plus modifiée.

La différence entre la courbe initiale et cette dernière courbe représente la courbe d'absorption de l'acide ascorbique contenu dans le tissu.

Cette courbe, qui est sensiblement homothétique de celle de l'acide ascorbique pur, permet, par comparaison avec cette dernière, de déterminer en mgr. par gr. la teneur en vitamine C du tissu.

Cette technique s'applique parfaitement au sang total.

Les nombreuses expériences, faites par Chevallier et Choron, ont démontré les avantages de cette méthode :

1° On ne dose que l'acide ascorbique ;

2° On dose la totalité de l'acide ascorbique puisque l'acide réversiblement oxydé est réduit ;

3° L'erreur possible est inférieure à 5 % ;

4° La durée totale d'une expérience : extraction, irradiation et mesures, ne dépasse pas une heure et demie ;

5° On opère sur de petites quantités.

Considérations. — Spécifique, exacte et d'une technique assez simple, le procédé de Chevallier et Choron constitue donc la méthode physique de choix.

Toutefois, en égard aux méthodes chimiques de MEUNIER ou de MENTZER, elle est relativement longue. Elle semble particulièrement indiquée comme moyen de contrôle.

METHODES HISTOCHIMIQUES

Méthode de Glick

GLICK et ses collaborateurs [113], [114], (*) s'inspirant de la méthode de microdosage des enzymes de LINDERSTROMM-LANG [71], d'une part, et du procédé de TILLMANS, d'autre part, ont mis au point une technique permettant de doser la vitamine C sur des coupes histologiques.

Pour cela, on découpe à l'emporte-pièce dans l'organe congelé un cylindre de 4,5 mm. de diamètre que l'on débite en tranches uniformes de 40 μ ou de 20 μ, au moyen d'un microtome à congélation.

Dans un petit tube contenant 50 mmc. d'acide acétique à 9 %, on met soit une tranche de 40 μ, soit deux de 20 μ. Le liquide est agité par un dispositif magnétique afin de faciliter l'extraction.

On dose directement dans le tube à extraction en ajoutant le dichlorophénol (solution suivant la formule habituelle) avec une microburette graduée au 0,2 mmc. On teste préalablement le système sur une solution connue d'acide ascorbique. Un tube témoin au rose Bengale à 1/1.000.000 sert à apprécier les virages.

On peut aussi obtenir les valeurs de la vitamine C contenue dans les courbes successives d'un organe complexe.

Après une légère fixation, on monte les coupes dosées et on les colore. D'après le type cellulaire, on identifie la zone de l'organe examiné et on établit ainsi des courbes de titration superposables aux différentes parties d'un organe. On peut encore compléter ces recherches en calculant le contenu de chaque type cellulaire. En effet, connaissant la quantité de vitamine contenue dans une région donnée, il suffit de compter le nombre de cellules qui s'y trouvent. Comme cette numération s'effectue sur des coupes paraffinées, il y a lieu de tenir compte de la rétraction du volume tissulaire

(*) D. GLICK, *Jour. Biol. Chem.*, 1935, 109, p. 433. 1935, 110, pp. 1 et 583. D. GLICK et G. R. BISKIND, *Jour. Biol. Chem.*, 1936, 115, p. 551.

qui se produit dans cette technique. Il est donc nécessaire d'effectuer une correction. Pour obtenir le nombre de cellules dans une coupe fraîche d'après celui que l'on observe sur une coupe à la paraffine de même volume, il suffit de diviser le nombre trouvé par 1,73.

Méthode de Giroud et Leblond

De nombreux auteurs ont utilisé les méthodes argentiques en histologie ou en histochimie pour rechercher différents corps (phosphate de calcium, chlorures, composés puriques, etc.).

En 1933, Bourne (270) avait tenté de mettre en évidence histologiquement l'acide ascorbique dans les tissus au moyen du nitrate d'argent, mais comme il utilisa cette réaction après fixation au formol, il ne put obtenir de résultats précis.

La méthode de Giroud et Leblond (115) (*) se distingue surtout des techniques au nitrate d'argent par l'absence de tout réducteur surajouté, car c'est l'acide ascorbique lui-même qui joue ce rôle. Elle est caractérisée par le fait qu'elle est instantanée, qu'elle s'effectue à l'obscurité, qu'elle utilise un réactif stable et, du point de vue technique, par le fait que le réactif est porté directement au contact même des cellules vivantes sans action préalable d'aucune substance.

Technique. — Parmi les différents sels d'argent que l'on peut employer comme réactif, le nitrate s'est révélé nettement préférable. Pour rendre ce réactif plus spécifique, on doit l'employer après acidification acétique ou nitrique. On utilisera avantageusement la formule suivante dont le pH est au voisinage de 3 :

Nitrate d'argent	100 gr.
Acide acétique glacial.....	10 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

Sous cette forme, le nitrate d'argent agit comme fixateur et comme réactif. Au moment de la pénétration du réactif, les tissus deviennent blanchâtres (coagulation du proto-

(*) A. Giroud et C. P. Leblond, *L'acide ascorbique dans les tissus et sa détection.*

Actualités scientifiques et industrielles, n° 435, Hermann et Cie, éd., Paris, 1936.

plasme) puis, au bout de quelques secondes, ils deviennent grisâtres et enfin noir bleu par réduction métallique.

On tue l'animal par saignée en ayant soin de vider le plus complètement possible les vaisseaux de leur sang. On utilise pour les injections des aiguilles de verre ou de métal paraffiné.

1° On chasse le sang résiduel en lavant les vaisseaux avec une solution isotonique de fructose à 5 % ;

2° Immédiatement après le lavage des vaisseaux on fait l'injection du nitrate en doses variables suivant le poids de l'animal (100 cc. pour un rat). Cette opération ainsi que les suivantes doivent être exécutées à l'abri de la lumière.

L'injection de nitrate se fait le plus souvent par la voie artérielle, mais on peut, dans certains cas, employer la voie veineuse et même la voie interstitielle. On laisse en contact une dizaine de minutes ;

3° On lave les vaisseaux avec de l'eau distillée, ce qui élimine une grande partie du nitrate d'argent ;

4° On découpe les organes et on les lave à l'eau distillée. On peut alors les mettre dans l'alcool à 95° si l'on désire les monter à la paraffine, ou les couper directement à congélation.

Pour le montage à la paraffine, on suit la technique habituelle, mais comme l'élimination du nitrate d'argent par lavage est incomplète, il faut effectuer ces opérations à l'abri de la lumière.

Les coupes, une fois faites, sont collées sur lame et séchées à l'obscurité. Après déparaffinage, on les débarrasse définitivement des traces de nitrate d'argent en les faisant séjourner dix minutes dans l'eau, vingt minutes dans l'hyposulfite et trente minutes dans l'eau courante ;

5° Les préparations sont entièrement incolores, à l'exception des points où le nitrate d'argent est réduit sous forme de granulations noires d'argent métallique. On peut les contre-colorer au bleu de méthylène. Montées dans le baume, ces coupes sont très stables.

La réaction au nitrate acide, suivant la technique de Giroud et Leblond, semble assez spécifique. Toutefois, sa sensibilité peut être notablement diminuée par certaines substances inhibitrices, comme la cystéine et surtout le glutathion.

On peut utiliser cette méthode pour étudier la répartition de l'acide ascorbique dans les organes, les tissus et dans la cellule elle-même. On peut l'employer également pour observer les variations du taux en fonction d'une intoxication ou d'une infection. On peut s'en servir enfin pour apprécier la teneur en vitamine C d'un tissu animal ou végétal. Il suffit, pour cela, d'en nourrir un cobaye et de pratiquer l'injection argentique.

Mirimanoff [213] a montré que la méthode de Giroud et Leblond ne pouvait s'appliquer directement aux tissus végétaux, car ils contiennent des substances autres que l'acide ascorbique capables de réduire le nitrate d'argent dans les mêmes conditions.

Considérations. — Les méthodes histochimiques présentent un grand intérêt dans leur domaine propre, puisqu'elles permettent de rechercher, de localiser et même de doser l'acide ascorbique jusque dans la cellule.

Toutefois, elles constituent des moyens de détection plutôt que des procédés de dosage. Enfin, leurs techniques particulièrement délicates les tiennent éloignées de la pratique courante.

MODES D'EXTRACTION ET DE DÉFÉCATION

Avant tout dosage d'acide ascorbique dans un milieu biologique, il faut procéder à une défécation qui a pour but d'éliminer les colloïdes gênants. Cette défécation est toujours indispensable et, si elle n'est pas bien faite, elle peut être à l'origine de causes d'erreurs importantes.

Dans certains cas (urine, liquide céphalo-rachidien, jus de citron, etc.) on pourrait, à la grande rigueur, l'éviter, mais il est toujours préférable d'y avoir recours.

Les défécants les plus employés sont l'acide trichloracétique, l'acide métaphosphorique, l'acide chlorhydrique, l'acide silicotungstique, l'acétate mercurique, l'acétate acide de plomb, l'acétate neutre de plomb (réactif de Courtonne) et le sulfate d'ammonium.

Chacun de ces composés offre évidemment des avantages et des inconvénients. Il semble surtout nécessaire de choisir un défécant approprié suivant les cas.

Les défécations à base de sels de plomb, qui provoquent

généralement une perte notable d'acide ascorbique, ne sont pas recommandées.

L'acide chlorhydrique à 3 % convient parfaitement pour l'urine, tandis que le mélange acide trichloracétique (14 %) et acide métaphosphorique (2 %) permettra une excellente désalbumination du plasma.

Le lait sera traité avantageusement par l'acide silico-tungstique à 5 %.

D'après MENTZER (319), le sulfate d'ammonium à saturation provoque la précipitation intégrale non seulement des protides, des lipides et des glucides à poids moléculaire élevé, mais encore celle des pigments. On élimine ainsi des catalyseurs comme la lactoflavine, qui accélère la destruction de la vitamine C. Cette technique, qui permet d'obtenir des filtrats limpides et incolores avec presque tous les tissus animaux et végétaux, semble présenter d'incontestables avantages par rapport aux autres défécants.

Enfin, dans tous les cas, si l'on veut procéder au dosage des formes réduites et oxydées reversiblement de l'acide ascorbique, on peut traiter le liquide d'extraction par l'hydrogène sulfuré, puis chasser ce dernier par un courant d'azote.

CONSIDERATIONS ET CONCLUSIONS

Devant la multiplicité des méthodes de dosage de la vitamine C, il est évidemment assez délicat de faire le choix d'une technique. Il nous semblerait, quant à nous, assez logique de considérer deux cas :

1° *Dans les recherches de Laboratoire*, où l'on exige le maximum de précision, il faut avoir recours soit à la méthode de MEUNIER, soit à la méthode de MENTZER. Ces deux procédés sont spécifiques, précis et rapides. De plus, ils permettent de faire des dosages en série tout en opérant sur de petites quantités. Enfin, comme les deux méthodes fournissent des résultats sensiblement identiques, il sera recommandé de les employer concurremment à titre de contrôle. On pourra également vérifier les résultats par un autre procédé chimique (méthode d'ESPIL et GENEVOIS) ou physique (méthode de CHEVALLIER et CHORON).

2° *En clinique*, le diagnostic des états de précarence peut s'effectuer de différentes façons : épreuve de GÖTHLIN,

épreuve de DALLDORF, test de décoloration de ROTTER, test de surcharge, etc. (cf. infra, chapitre VIII).

Généralement associé au test de surcharge, le dosage de l'acide ascorbique dans l'urine peut se faire par la méthode titrimétrique de TILLMANS, très simplifiée. Les résultats ainsi obtenus présentent une approximation qui, dans la plupart des cas, est suffisante. On peut toutefois, si l'on désire des précisions, employer d'autres procédés. Là encore, si l'on dispose du matériel nécessaire, les méthodes de MEUNIER et de MENTZER s'imposeront comme les plus pratiques et les plus sûres.

CHAPITRE VI

Répartition

La répartition de la vitamine C, dans le règne végétal comme dans le règne animal, présente un grand intérêt, non seulement au point de vue physiologique ou biochimique, mais encore au point de vue diététique. En effet, la connaissance précise de la teneur des aliments, surtout d'origine végétale, en acide ascorbique, est un facteur important pour établir un régime bien équilibré.

Aussi avons-nous pensé qu'il serait intéressant de réunir, sous forme de tableaux synoptiques, faciles à consulter, les résultats analytiques obtenus par différents auteurs. Toutefois, ce travail de récapitulation est souvent décourageant, car les chiffres ainsi trouvés ne concordent guère, et cela pour trois raisons essentielles :

a) La teneur en vitamine est très variable suivant la saison, le climat ou la latitude. Il suffit de comparer les résultats obtenus en ce qui concerne la répartition de l'acide ascorbique dans le lait pour constater des divergences appréciables suivant le pays d'origine.

b) La diversité des méthodes employées pour doser la vitamine C est très préjudiciable, car les techniques sont d'inégale valeur et donnent des résultats peu comparables.

c) Les auteurs n'expriment pas toujours leurs résultats analytiques de la même façon. Les conférences internationales ont bien abouti à l'adoption d'étalons et d'unités internationales de vitamines, mais toutes les expérimentations utilisables ne sont pas postérieures à ces décisions, et il faut établir des liens d'équivalence entre les diverses unités proposées auparavant.

En ce qui concerne les aliments d'origine végétale, nous avons, pour pallier à ces difficultés, adopté le principe utilisé par le docteur Maurice UZAN dans son remarquable ouvrage « Vitamines des Aliments » ; c'est pourquoi, après avoir donné les taux extrêmes, nous indiquons la *teneur moyenne pratique.*

Dans le règne animal, où la répartition de l'acide ascorbique présente surtout un intérêt d'ordre physiologique et biochimique, nous n'avons généralement pas employé ce procédé. En effet, le rôle diététique des aliments carnés, du moins en ce qui concerne l'apport en vitamine C, est relativement faible. Sans doute, le foie crû, par exemple, constituerait une source abondante d'acide ascorbique, mais il est bien évident que, s'il s'agit uniquement de compenser une déficience de l'organisme en vitamine C, on utilisera de préférence des aliments d'origine végétale. Aussi, l'indication d'une teneur moyenne pratique ne nous semblait pas justifiée en ce domaine.

En comparaison des autres vitamines, l'acide ascorbique agit à des doses relativement élevées. C'est pourquoi son dosage par des méthodes chimiques directes est facilement réalisable. Aussi l'adoption d'unités particulières qui est indispensable pour la plupart des vitamines, ne semble pas nécessaire pour l'acide ascorbique. Nous rappelons, à titre documentaire, les équivalences d'unités qui sont admises :

1 Unité internationale (U. I.) = 0,05 mgr. d'acide l ascorbique ;

1 Unité Sherman (U. S.) = 10 U. I. = 0,5 mgr. d'acide ascorbique.

A l'heure actuelle, en ce qui concerne la vitamine C, on a pratiquement abandonné ce principe et les résultats sont directement exprimés en milligrammes.

NOTA. — *Dans les tableaux suivants et sauf mention spéciale, le taux d'acide ascorbique est exprimé en milligrammes pour cent grammes ou pour 100 cc., s'il s'agit d'un liquide.*

REGNE VEGETAL

Le règne végétal est très riche en vitamine C, et la plupart des plantes sont douées à un degré plus ou moins accusé de propriétés antiscorbutiques. Toutefois, la teneur en acide

ascorbique est très variable. Elle dépend de la partie considérée (feuille, fruit, tubercule, etc.) ainsi que de l'état du développement de la plante (germination, maturation, etc.).

On trouve la vitamine C surtout dans les tissus riches en chlorophylle (feuilles) ou en caroténoïdes (fruits). Dans les graines, il n'y a pas d'acide ascorbique. Il apparaît au cours de la germination, augmente dans la plante jeune jusqu'à la floraison pour croître ensuite de nouveau. On rencontre la vitamine C sous la forme libre, oxydée ou combinée. Cette fraction combinée, selon Bezssonoff (206), atteindrait parfois jusqu'à 30 %, ce qui est confirmé par Mc. Henry et Graham (152), ainsi que par Guha et Pal (153). Reedmann et Mc. Henry (207) signalent des combinaisons protéiques. Perrot (170) l'aurait trouvée à l'état de glucoside. Elle semble exister aussi à l'état de provitamine, mais l'existence de cette dernière est discutée.

Enfin, d'après Mirimanoff (213), la répartition de l'acide ascorbique serait spécifique de chaque organe, et même de chaque partie d'un organe. Pour cet auteur, en effet, les teneurs globales d'un organe végétal sont très variables avec les individus, mais, par contre, les valeurs relatives de ces teneurs le sont très peu. En outre, il confirme que la photosynthèse joue un rôle très important dans la richesse d'un organe en acide ascorbique.

Huiles végétales. — Les huiles d'amandes douces, d'arachides, de coco, de coton, de lin, de noix, de noisettes, d'olives, de palme, de sésame, etc., ne contiennent pas de vitamine C.

Céréales. — L'acide ascorbique ne se rencontre généralement pas dans les céréales, sauf dans le maïs jaune. Par contre, les céréales germées en renferment de notables proportions. La farine et ses dérivés (pain, pâtes alimentaires, etc.) sont dépourvus de toute action antiscorbutique (cf. tableau I).

Condiments. — Les condiments, et en particulier les diverses variétés de piments, sont très riches en vitamine C (cf. tableau II).

Légumes et fruits. — Les légumes et les fruits contiennent pour la plupart de très fortes proportions d'acide ascorbique. Ils constituent des aliments antiscorbutiques de choix. Tou-

tefois, leur activité vitaminique ne se manifeste pleinement qu'à l'état frais. Aussi est-il recommandable de consommer, dans la mesure du possible, des légumes crûs (hors-d'œuvre, salades, etc.). Dans cet ordre d'idées, les fruits semblent répondre mieux encore à ces exigences puisqu'ils sont le plus souvent absorbés à l'état naturel (cf. tableaux III et IV).

Remarques. — a) Giroud et ses collaborateurs [161] ont montré qu'il y a un parallélisme certain entre la teneur des plantes en carotène, lycopène et corps voisins, et le taux d'acide ascorbique. Par conséquent, ce sont les fruits et les légumes les plus colorés (en jaune ou rouge) qui sont les plus riches en vitamine C.

En effet, des fruits comme les prunes, les poires, les pêches, les nèfles, qui sont très pauvres en pigments caroténoïdes, contiennent peu d'acide ascorbique. Par contre, l'évolution de la teneur en vitamine C de fruits colorés comme la tomate, l'orange et le piment, fournit un tableau caractéristique.

	Fruit vert	Fruit rouge
Tomate	27	33
Orange	45	50
Piment	173	182

De même, l'augmentation de la teneur en acide ascorbique de la papaye pendant la maturation confirme ce fait.

Papaye :	fruit très vert	26,5
—	fruit vert (un peu de jaune dans la chair)	32,3
—	fruit moins vert (chair jaune, mais dure)	46,4
—	fruit mûr (chair jaune et molle)	61,8

Notons toutefois, comme l'a démontré Mirimanoff [213], qu'il ne faut pas voir dans ce parallélisme une règle, mais simplement une corrélation.

b) Les parties flétries, étiolées des végétaux voient leur taux en acide ascorbique décroître.

c) Les fruits « forcés » ou mûris loin de leur pays d'origine perdent une grande partie de leur vitamine C. A cet égard, l'exemple de la banane est des plus caractéristique. Mûrie

dans les pays tropicaux, la banane renferme jusqu'à 15 mgr. % d'acide ascorbique. Mûrie en Suède, elle ne conserve pas sa vitamine C.

d) Très souvent, les peaux des fruits contiennent plus d'acide ascorbique que la chair même. D'ailleurs, à mesure que le fruit mûrit, il semble que la vitamine persiste mieux dans le zeste. Là encore, on retrouve le parallélisme entre les pigments caroténoïdes et la teneur en acide ascorbique.

	Jus	Peau
Citron	54 à 68	100
Orange verte	70,5	105,6
Orange mûre	62,7	131,3
Orange très mûre	34,5	108,8
Pomme-var. Bramley's Seedling	16	77
Pomme-var. Edward VII	1,7	12

Champignons et Levures. — Bien que certains auteurs prétendent que les champignons ne renferment pas de vitamine C, Lévy et Fox (151) y ont trouvé 1,9 mgr. % d'acide ascorbique, tandis que Giroud et ses collaborateurs (158), (162) y décèlent jusqu'à 5 mgr. %.

Les levures ne contiennent pas de vitamine C.

Boissons. — La bière ne contient pas d'acide ascorbique. Le cidre a une teneur en vitamine C proportionnelle à celle des pommes qui ont servi à le fabriquer. Le jus de raisin frais renferme 2,5 mgr. % d'acide ascorbique. Les vins naturels ayant subi peu de manipulations en contiennent des traces, mais on n'en trouve plus dans les vins traités. Le café vert, de même que le maté à l'état frais renferment un peu d'acide ascorbique, mais les traitements ultérieurs (torréfaction, cuisson) le détruisent. Le thé vert contient de la vitamine C, le thé noir en garde encore des traces, mais l'infusion de thé semble en être complètement dépourvue.

La vitamine C dans les conserves. — Des expériences faites par Lecoq sur des rats, des pigeons et des cobayes nourris uniquement avec des conserves ont montré que ces animaux ne présentaient aucun signe d'avitaminose. De

nombreux auteurs ont pu constater des résultats analogues. D'ailleurs, une véritable expérience humaine a été réalisée en 1932-1933, par une mission française au Pôle Nord. Au cours de cette expédition, quinze hommes vécurent au Groënland pendant treize mois en de parfaites conditions malgré une alimentation où les produits frais faisaient totalement défaut. Toutefois, une large part avait été réservée aux conserves de légumes et de fruits, qui devaient apporter la vitamine C, dont ils constituaient la seule source. A aucun moment, malgré un contrôle minutieux, on n'a pu observer le moindre signe de scorbut.

Edelstein (163) et Reiche (164) ont constaté que des enfants nourris exclusivement de conserves de fruits et de légumes ne présentaient aucun trouble. Olliver-Mammie (155) fait observer que la vitamine C est répartie d'une façon sensiblement égale entre la partie solide de la conserve et son jus liquide. C'est principalement dans l'intervalle qui sépare la cueillette de la fermeture du récipient que se produit la destruction de l'acide ascorbique. Cet auteur a constaté, après la mise en boîte, une perte de 10 à 40 % pour les légumes et de 5 à 20 % pour les fruits.

De même, Lunde et Mathiesen (148) ont noté des pertes importantes au moment du blanchiment ou du verdissage qui précède la mise en boîte.

La dessication permet de conserver l'activité du facteur C dans les fruits et les légumes, lorsque cette opération a lieu dans certaines conditions qui les mettent à l'abri de l'oxydation et de l'influence des alcalis.

Les produits desséchés dans le vide en présence, soit d'anhydride phosphorique, soit d'anhydride sulfureux, conservent mieux leur vitamine C que si la dessication a lieu en présence de chlorure de calcium.

Morgan et Field (166) ont établi que les pêches de Californie, desséchées en présence d'anhydride sulfureux, conservent une plus grande quantité d'acide ascorbique que les pêches desséchées au soleil ou en l'absence d'anhydride sulfureux. Harden et Robinson (167) ont démontré que des jus de citron et d'orange desséchés dans le vide à 35° restent actifs pendant deux ans s'ils sont conservés au frais, et qu'ils perdent leur activité en quatorze mois s'ils sont exposés à une température de 29°.

D'autre part, Gaudücheau (168) estime que la majeure

partie de la vitamine n'est pas détruite par l'autoclave, et SIMONNET a pu trouver jusqu'à 85 % d'acide ascorbique dans du lait pasteurisé.

De toutes ces constatations, il faut donc conclure que le facteur C existe en quantités importantes dans les conserves. Les pertes que l'on peut observer proviennent uniquement de l'oxydation de la vitamine, qui est détruite rapidement par l'oxygène de l'air et l'oxygène qui existe normalement dans les plantes ou les fruits. L'élévation de la température a simplement pour effet d'accélérer cette oxydation.

Par différents procédés, on est arrivé à enlever tout l'oxygène contenu dans l'aliment et dans la boîte avant la stérilisation. Ainsi, il suffira, par exemple, de chauffer le jus de tomate pendant quelques instants pour éliminer son oxygène. De même, la pomme pelée et découpée en quartiers sera immergée dans l'eau salée un temps suffisant pour que l'oxygène passe dans le liquide avant la stérilisation.

Bien entendu, les ustensiles de cuisine servant à la préparation des conserves, ainsi que les boîtes de conserve elles-mêmes, devront être d'un métal judicieusement choisi, en raison de l'action catalytique du cuivre et du fer sur l'oxydation de l'acide ascorbique.

Des conserves industrielles, préparées dans de bonnes conditions et avec les soins convenables, perdent une quantité d'acide ascorbique variant entre 5 et 40 %. On estime qu'il y a persistance de la vitamine pendant deux ans et peut-être même davantage.

Les conserves ménagères de légumes et de fruits sont bien moins intéressantes, car il est difficile de leur appliquer les procédés utilisés dans l'industrie pour éliminer l'oxygène. Aussi, peut-on y constater une perte en acide ascorbique variant de 50 à 80 %. Cependant, les tomates entières, même cuites longtemps, gardent une grande partie de leur vitamine C [101].

L'emploi de substances chimiques diverses (bisulfites alcalins, sulfate de cuivre, acide salicylique, bicarbonate de sodium, etc.) conseillés par divers auteurs pour les conserves ménagères, est à prohiber totalement. On sait, par exemple, que l'alcalinisation du milieu favorise la destruction du facteur C, surtout en présence de la chaleur. Aussi, l'addition de bicarbonate de sodium dans l'eau, qui sert à la cuisson des légumes, est-elle très préjudiciable à la conser-

vation de l'acide ascorbique. D'après RANDOIN et SIMONNET, lorsque l'oxydation n'entre pas en ligne de compte, la chaleur à elle seule est sans effet en milieu acide, mais destructive en milieu alcalin.

Signalons enfin que, d'après MARTEL [169], la congélation serait le meilleur moyen de conserver la vitamine C dans les aliments.

TABLEAU I

CÉRÉALES	Minima	Maxima	Moyenne pratique	RÉFÉRENCES
Avoine	»	»	0	(142)
Avoine germée (après 90 h. de germination)	»	»	20	(134)
Avoine germée (après 120 h. de germination)	»	»	42	(134)
Avoine germée (après 7 jours de germination)	15	17,5	»	(143)
Blé	»	»	0	»
Blé germé à l'obscurité	»		15	(158) (162)
Blé germé à la lumière	»	»	74	(158) (162)
Farine et dérivés (pain, pâtes alimentaires, etc.)	»	»	0	»
Maïs jaune	3,5	8,05	»	(135) (137) (152)
Orge	»	»	0	»
Riz	»		0	»
Riz germé	»	»	traces	»
Seigle	»	»	0	»

NOTA. — *Les guillemets figurant dans les tableaux servent uniquement à faciliter la lecture. Ils n'ont pas de signification particulière et ils n'indiquent en aucun cas la répétition des chiffres ou des références qui sont mentionnés à la ligne précédente.*

TABLEAU II

Condiments	Minima	Maxima	Moyenne pratique	Références
Ail à l'état frais	9	25	10	(151)
Ail conservé cru	»	»	5,2	(137)
Cacao	»	»	0	»
Coriandre (feuilles jeunes)	17	135,2	50	(135)
Coriandre (graines)	»	»	0	(135)
Cumin	»	»	3	(135)
Gingembre	»	»	20	»
Miel	»	»	traces	»
Moutarde (Brassica cernua)	39	81	40	»
Oignon à l'état frais	9	23	15	(135) (136) (137) (152)
Oignon conservé cru	»	»	10	»
Oignon cuit	»	5	3,1	(152)
Piment vert doux	47	200	120	(136) (138) (146)
Piment vert	»	173	115	(158) (162)
Piment rouge	50	250	182	(31) (135) (136) (137)
Paprika hongrois	100	200	150	(31)
Poivre	»	150	100	»
Raifort (feuilles)	»	»	60	»
Sucre de canne (sirop)	»	»	0,4	»

TABLEAU III

LÉGUMES	Minima	Maxima	Moyenne pratique	RÉFÉRENCES
Artichaut cru	1	10	7	(135)
Artichaut bouilli 1/2 heure	»	5	3	»
Asperge	»	»	12	(152)
Asperge cuite	»	»	8,2	(152)
Aubergine - chair	»	»	20	»
Aubergine - peau	»	»	80	»
Betterave - feuilles	»	»	42	(158) (162)
Betterave - racine	»	»	20	(158) (162)
Carotte crue	5	15	8	(135) (136) (137) (148) (151)
Carotte cuite	2	3	2	»
Cerfeuil	»	»	60	(148)
Chou cru	15	133	50	(135) (136) (137) (139) (152)
Chou après 10 min. d'ébullition	»	»	40,5	(137)
Chou après 17 min. d'ébullition	»	»	29,2	(137)
Chou après 30 min. d'ébullition	»	»	22,3	(137)
Chou après 1 heure d'ébullition	»	»	14,8	(137)
Chou après 2 heures d'ébullition	»	»	1,56	(137)
Chou pommé vert	»	90	50	»
Chou blanc	»	30	20	»
Chou rouge	»	70	45	»
Chou de Bruxelles cru	71,8	120	45	(135) (148)
Chou-fleur cru	6	90	40	(135) (137) (152)
Chou-fleur - feuilles	»	113	»	(151)
Chou-fleur - fleurs	»	53	»	(151)
Chou-fleur cuit	»	31	20	»
Choucroute	6	10	8	(151)
Jus de choucroute fraîchement exprimé	»	»	9,8	(196)
Jus de choucroute conservé	2	8,2	4	»
Concombre	1,2	6,9	4	(137) (155)
Concombre jaune	»	7,8	5	(151)
Cresson	»	»	100	»
Epinard cru du jour (suivariété et conditions de culture)	6	89	60	(135) (136) (137) (152)
Jus d'épinard	16	52	40	»
Epinard cuit	8	15	13	(152)
Jus d'épinard cuit	»	»	8	»

TABLEAU III (Suite)

LÉGUMES	Minima	Maxima	Moyenne pratique	RÉFÉRENCES
Epinard conservé	5	20	15	(136) (138)
Epinard conservé 3 jours à 3°	»	76	»	»
Epinard conservé 3 jours à 25°	»	39	»	»
Epinard conservé 7 jours à 3°	»	72	»	»
Epinard conservé 7 jours à 25°	»	3	»	»
Haricot vert frais	1,4	49,4	12,5	(135) (137) (151) (152)
Haricot vert cuit	»	2,5	2	(152)
Haricot vert conservé	»	4	3	(138)
Haricot sec	1,25	4	3	(137) (155)
Laitue verte	»	»	30	(135) (158) (162)
Laitue blanche	»	»	6	(158) (162)
Lentille	»	»	3	(137)
Luzerne	330	380	»	(151)
Navet	20	43,4	30	(135) (136) (137) (152)
Navet cuit	»	18	15	(152)
Oseille - feuille	»	100	80	»
Persil	122	280	180	(135) (136) (138) (151)
Pissenlit	50	60	55	(148)
Poireau entier d'automne	»	»	30	»
Poireau entier d'été	»	»	60	»
Poireau entier cuit	»	»	10	»
Pois ordinaire cru	16	20	18	(151)
Pois mange-tout cru	»	120	100	»
Pois ordinaire cuit	»	7	6	(138)
Pois mange-tout cuit	»	76	50	»
Pois conservé	»	»	5	(138)
Pois sec	»	»	0	(151)
Pomme de terre crue nouvelle	15	40	20	(138) (139) (141)
Pomme de terre crue vieille	5	20	8	(138) (139) (141)
Pomme de terre frite	»	10	4	(135)
Pomme de terre bouillie	»	16	10	(135)
Pomme de terre bouillie avec peau	»	20	15	(135)
Pomme de terre après 6 heures de cuisson	»	»	6	(135)
Radis entier	11	45	30	(135) (137) (151)
Radis - peau	»	»	45	»
Radis - chair rose	»	»	17	»

TABLEAU III (Fin)

Légumes	Minima	Maxima	Moyenne pratique	Références
Radis - chair blanche.....	»	»	11	»
Radis - feuilles jeunes.....	»	114	»	(137)
Scarolle - feuilles vertes.....	»	»	11,2	»
Scarolle - feuilles étiolées...	»	»	10,4	»
Soja - graine.....	»	»	11	(137)
Soja - feuilles.....	»	»	33,3	(137)
Tomate tétraploïde.....	»	50	30	(171)
Tomate verte.....	»	27	15	(135) (158) (162)
Tomate rouge.....	15	33	20	(135) (158) (162)
Purée de tomate conservée..	5,4	22	13	(152)
Jus de tomate conservé.....	13	29	16	»

TABLEAU IV

Fruits	Minima	Maxima	Moyenne pratique	Références
Abricot frais	0,8	15	8	(151)
Abricot sec	»	»	traces	(135)
Amandes	»	»	0	(136)
Ananas - fruit	7	62,9	15	(135) (137) (155)
Ananas - jus frais	»	30	»	»
Ananas - jus conservé	»	12	»	»
Avocat	9	13	9	(142) (151)
Banane	2,4	15	1	(139) (151)
Cassis	90	130	»	(148)
Cerise	4,1	22	10	(151)
Chair de châtaigne fraîche	»	50	»	»
Chair de châtaigne sèche	»	1,2	»	»
Citron - substance fraîche	45	70	50	(172)
Citron - zeste	»	100	»	(145)
Citron - jus	19	73	55	(134) (144) (145) (151) (155)
Citron - jus conservé	41	58	45	»
Noix de coco (cocos nucifera)-suc	1,66	5	2	(135) (137) (149)
Noix de coco - suc avant la formation du noyau	»	»	1,32	(149)
Noix de coco - suc après la constitution du noyau	»	»	2,2	(149)
Noix de coco mûre - noyau	»	»	0,28	(149)
Noix de coco mûre - suc	»	»	traces	(149)
Dattes	»	2	1	»
Figue fraîche	0,25	2,4	0,25	(151)
Figue séchée (avec ou sans sulfuration)	»	»	0	(135)
Fraise cultivée	10	80	40	(148)
Fraise des bois	15	90	50	(148)
Framboise	25	40	30	(148)
Goyave	56	150	100	(151) (155)
Grenade - fruit	»	»	11	(155)
Grenade - jus	»	»	15,6	(137)
Groseille	22	50	45	(148)
Groseille à maquereau	»	60	50	(148)
Mandarine	10	78	30	(145) (151)
Mangue	2	176	80	(155)
Melon	1,5	20	10	(151) (155)
Mûre	80	100	80	(148)
Nèfles	»	»	2	(158) (162)
Noisettes	»	»	0	»
Noix	»	»	0	»

TABLEAU IV (Fin)

FRUITS	Minima	Maxima	Moyenne pratique	RÉFÉRENCES
Orange verte	45	80	50	(158) (162)
Orange verte - zeste	»	105,6	»	(135)
Orange verte - jus	»	70,5	»	(135)
Orange mûre	50	100	60	(158) (162)
Orange mûre - zeste	»	131,3	»	(135)
Orange mûre - jus	»	62,7	»	(135)
Jus d'orange	22	89	55	(145) (151)
Zeste d'orange	105	220	»	(145) (151)
Jus d'orange amère	»	34	»	»
Jus d'orange conservé	31	56	35	»
Pamplemousse	»	53	45	(138)
Jus de pamplemousse	30	65	»	(134) (136) (137) (151)
Jus de pamplemousse conservé	29	42	»	»
Papaye	19	77	50	(135) (136) (151) (155)
Pastèque	»	7	2	(155)
Pêche	1	18	8	(137) (151)
Pêche sèche avec peau	»	»	1	»
Poire fraîche	1	5	4	(158) (162)
Poire sèche avec peau	»	»	1	»
Pomme fraîche (suivant variété)	1	20	6	(135) (137)
Pomme var. Bramley's Seedling - peau	»	77	»	(139)
Pomme var. Bramley's Seedling - chair	»	16	»	(139)
Pomme var. Edward VII - peau	»	12	»	(139)
Pomme var. Edward VII - chair	»	1,7	»	(139)
Prune fraîche	1	10	2	(158) (162)
Pruneau sec	»	»	0	»
Raisin frais	1	4	2	(137) (139) (151)
Jus de raisin	»	2,5	»	»
Sorbe des oiseaux	»	80	»	(148)

TABLEAU V

Plantes diverses	Taux en mgr. pour 100 gr.	Références
Amaranthus gangeticus	25	(144)
Amaranthe verte	37 - 117	(144)
Aubépine (Crataegus oxyacantha) - fruit	500	»
Chrysanthème - feuilles	28	(158) (162)
— - fleurs	16	(158) (162)
Dahlia blanc - feuilles	25	(158) (162)
— - fleurs	12	(158) (162)
Dioscorea cirrhosa (igname)	9,2	(141)
Eglantine (Rosa canina) - fruit	1.000	»
Glechoma hederacea à feuilles panachées - parties vertes	82	(158) (162)
Glechoma hederacea à feuilles panachées - parties blanches	22	(158) (162)
Iris germanica	600	(174)
Moringa oleifera	191	(173)
Orobanche amethystina	6	(158) (162)
Pastinaca sativa (Panais comestible) - feuilles	82	(158) (162)
— — - racines	3	(158) (162)
Physalis peruviana (alkékenge)	26	(172)
Phyllanthus emblica (Euphorbiacées)	413	(173)
Quercus robur - feuilles vertes	162	»
— - feuilles jaunes	95	»
Rose - feuilles	188	(158) (162)
— - fleurs	52	(158) (162)
Sesbania grandiflora - feuilles	189	(173)
Sceau de Salomon - parties aériennes	7	(158) (162)
— - parties souterraines	2	(158) (162)
Troëne panaché - parties vertes	114	(158) (162)
— - parties jaunes	96	(158) (162)
Viola tricolor - substance fraîche	136	(158) (162)
Zizyphus (jujube)	540	(172)

REGNE ANIMAL

L'acide ascorbique existerait dans l'organisme sous plusieurs formes : la forme réduite et la forme oxydée ; enfin, on envisage aussi l'existence d'une forme combinée.

Le taux normal en acide ascorbique

Giroud et ses collaborateurs (175) ont pratiqué de très nombreux dosages sur divers organes d'animaux (cf. tableau VI).

Ce tableau permet de faire les constatations suivantes :

a) Les organes les plus riches en acide ascorbique sont les surrénales, l'hypophyse et le foie ;

b) La teneur d'un organe donné est sensiblement constante quelle que soit l'espèce considérée. Ce taux n'est pas forcément identique. Il varie quelque peu, mais ses oscillations autour d'une moyenne sont assez limitées.

Ces mêmes caractéristiques se retrouvent ailleurs que chez les vertébrés supérieurs. Chez d'autres homéothermes, comme les oiseaux, on peut faire des constatations analogues. On notera toutefois que le taux rénal est légèrement supérieur. Chez les vertébrés poïkilothermes (tortue, crapaud, grenouille, etc.) et même chez les invertébrés (huître, homard, moule, etc.), on aboutit aux mêmes conclusions (cf. tableaux VII et VIII).

TABLEAU VI

D'après GIROUD, LEBLOND, RATISMAMANGA et GERO (175).

ORGANES	BŒUF (Bos taurus)	CHEVAL (Equus caballus)	CHIEN (Canis familiaris)	MOUTON (Ovis aries)	RAT (Mus rattus)
Cerveau	16,61	18,5	13,4	15,4	27
Estomac	6,3	8	4	6,5	16,6
Foie	29	20,3	26	20,6	23,6
Ganglion lymphatique	51	44	27,6	45,4	57
Hypophyse	126	136	101	139,6	106
Intestin grêle	18	17	18	20,2	22,6
Gros intestin	7,3	6,8	7	10,4	19
Muscle squelettique	1,6	1,3	1,7	2,55	3,1
Muscle cardiaque	3,8	3,3	3,6	6,2	4,6
Muscle lisse	6,3	5,3	4	10,8	18,7
Poumon	18,2	18	14,6	12,6	27
Rate	27,5	29	22,4	34	32,6
Rein	10,8	10,2	13,8	10,9	14,7
Surrénale	133	197,9	143,7	104,5	194,7
Testicule	30	46	45	34	26,3
Thyroïde	17	18	16,5	31,7	22

TABLEAU VII

Animaux divers	Mgr. pour 100 gr.	Références
Canard. — Surrénale	110,3	(175)
Foie	25,2	(175)
Rein	13,4	(175)
Chat. — Foie	18	(175)
Muscle	1,5	(175)
Rein	16,7	(175)
Surrénale	111,7	(175)
Thymus	50 - 60	(178)
Crapaud. — Cerveau	47	(181)
Cristallin	26	(181)
Estomac	14	(181)
Foie	24	(181)
Intestin	20	(181)
Langue	6	(181)
Muscle gastro-cnémien	4	(181)
Poumon	5	(181)
Rate	6	(181)
Rein	12	(181)
Sang	2	(181)
Testicules	12	(181)
Venin	26	(181)
Grenouille. — Foie	21,7	(175)
Rein	11,8	(175)
Muscle	2	(175)
Lapin domestique. — Cerveau	20	(183) (184)
Cerveau (lapin nouveau-né)	47	(183) (184)
Cœur	4	(183)
Foie	15 - 17,2	(175) (183)
Foie (lapin de 1 an)	13	(138)
Foie (lapin de 60 jours)	20	(138)
Muscle biceps (au repos)	0,99 - 2,07	(185)
Muscle biceps (après travail d'entraînement)	11,6 - 44	(185)
Œil - humeur aqueuse	20	(182)
Œil - cristallin	1	(183) (184)
Rein	10,2	(175)
Surrénale	95 - 160	(134)
Surrénale	207	(175)
Oie. — Surrénale	169	(175)
Foie	22	(175)
Rein	28	(175)

TABLEAU VII (Suite)

Animaux divers	Mgr. pour 100 gr.	Références
Perdrix. — Surrénale	206	(175)
Foie	45,5	(175)
Rein	25	(175)
Pigeon. — Surrénale	276,8	(175)
Foie	35,9	(175)
Rein	15,2	(175)
Pintade. — Surrénale	199	(175)
Foie	10,5	(175)
Rein	7	(175)
Porc. — Cerveau (porc jeune)	18	(138)
Muscle cardiaque (porc jeune)	4	»
Corps jaune (truie)	140 - 230	(138)
—	43 - 139	(179)
—	120 - 190	(178)
Foie	19 - 38	(138) (140)
—	25,8	(175)
Ovaire (truie)	29	(180)
Peau - corps muqueux	7 - 11	(158)
— - derme	3	(158)
— - couche cornée	1	(158)
Rein	10,3 - 14	(175)
Rétine	7 - 10	(176)
Surrénale	70 - 180	(177)
Surrénale	175,7	(175)
Poulet. — Surrénale	127	(175)
Foie	30	(175)
Rein	14	(175)
Tortue. — Foie	25,1	(175)
Muscle	1,3	(175)
Rein	12	(175)
Veau. — Foie	33	»
Œil - humeur aqueuse	20	(182)
Œil - rétine	7,7 - 17	(176)
Surrénale	75 - 172	(177)
Thymus (depuis le fœtus de 4 mois jusqu'à l'état de jeune animal)	35 - 52	(189)

TABLEAU VIII

Invertébrés	Mgr. pour 100 gr.	Références
Huître. — Hépato-pancréas	12	(175)
Muscle	3	(175)
Homard. — Hépato-pancréas	24	(175)
Muscle	5	(175)
Moule. — Hépato-pancréas	26	(175)
Muscle	6	(175)

On voit donc que chaque tissu ou organe possède un taux caractéristique d'acide ascorbique. Ce taux est remarquablement fixe, quel que soit l'animal envisagé. C'est ce que Giroud appelle fort justement le « *taux normal* ».

Mais ces constatations ne peuvent s'appliquer qu'aux animaux non carençables, c'est-à-dire aux animaux qui sont capables de synthétiser la vitamine C. Il existe, en effet, des organismes carençables comme ceux du cobaye, du singe et de l'homme, qui ne peuvent effectuer cette synthèse.

Chez un animal non carençable soumis à un régime scorbutigène, on ne constatera aucune variation sensible de la teneur des organes en acide ascorbique. Par contre, un animal carençable comme le cobaye, soumis à ce régime, accusera une diminution très importante du taux normal.

TABLEAU IX

Cobaye (animal carençable)	Cobaye normal	Cobaye carencé	Références
Cerveau	11	4	(190)
Foie	29	4	(190)
Hypophyse totale	90	30	(190)
Muscle	2	1	(190)
Peau (derme et épiderme)	3	1	(190)
Pulpe dentaire	9	»	(187)
Rein	11	2	(190)
Sperme	5,43	»	(188)
Surrénale totale	140	5	(190)
Tube digestif - estomac - gros intestin	10	»	(186)
- intestin grêle	20	»	(186)

C'est donc uniquement chez les animaux carençables que l'on observe des variations du taux d'acide ascorbique. Mais si ces animaux sont bien nourris, leurs organes seront aussi riches en vitamine C que ceux des autres espèces non carençables.

Ce taux constant d'acide ascorbique est certainement en rapport avec les fonctions essentielles des organes. Chez l'homme, les taux obtenus avec l'alimentation usuelle sont généralement insuffisants. Il y a donc certainement intérêt à voir réaliser chez les animaux carençables et chez l'homme, en particulier, un taux normal.

Signalons enfin que la liste des animaux carençables ne serait pas encore complètement connue. D'après KASCHEWNIK (210) et WEITZENBERG (211), le lapin serait carençable, de même que le chien, d'après INANTSY (212).

De tout ceci, on peut conclure que l'acide ascorbique est un *hormone* pour la plupart des êtres vivants, tandis qu'il est une *vitamine* pour le cobaye, le singe et l'homme, qui ne peuvent en faire la synthèse et qui doivent, par conséquent, trouver ce corps dans leur alimentation. C'est pourquoi d'ailleurs Mme RANDOIN et SIMONNET avaient proposé de désigner les vitamines apportées avec les aliments sous le nom *d'exhormones*, en réservant le nom *d'endhormones* aux substances à rôle analogue que l'organisme est capable de synthétiser lui-même.

Interprétation des résultats suivant la méthode de dosage employée

Nous avons vu précédemment les avantages et les inconvénients que présentaient les diverses méthodes de dosage de la vitamine C. Le tableau X montre bien que le choix d'une technique n'est pas indifférent.

On constate, en effet, que les chiffres obtenus au dichlorophénol-indophénol sont plus élevés qu'avec le bleu de méthylène. Cette différence semble due à d'autre corps réducteurs qui, par le premier procédé, sont dosés en même temps que l'acide ascorbique.

TABLEAU X

Organes divers	Bleu de méthylène Martini et Bonsignore	Dichloro, hénol indophénol Tillmans
Cerveau - substance grise	8	15,5
Foie	19	29
Glanglion lymphatique	36	51
Graisse cutanée	0,3	1
Humeur aqueuse	10	17,3
Hypophyse - lobe antérieur	126	161,1
- lobe intermédiaire	151	198
Intestin total	10,7	16
Liquide céphalo-rachidien (homme)	0,8	1,4
Muscle squelettique	0,6	1,6
Muscle cardiaque	2,8	3,8
Muscle lisse (estomac)	4	6,3
Ovaire sans corps jaune	17,8	20,5
Corps jaune	84	113,9
Pancréas	7,8	9,3
Rate	17	27,5
Rein total	7	10,8
Sang	0,7	1
Surrénale totale	123	128
— cortex	140	149
— médullaire	88	94
Thyroïde	13	17

Toutefois, les diverses modifications apportées aux principales méthodes que l'on emploie actuellement ont permis de perfectionner les techniques et de réduire très sensiblement les causes d'erreur. C'est pourquoi les résultats analytiques indiqués, même s'ils ne concordent pas toujours rigoureusement, présentent néanmoins une approximation plus que suffisante pour donner une idée exacte des valeurs réelles.

Répartition de l'acide ascorbique dans l'organisme

De très nombreux travaux utilisant les méthodes les plus diverses ont été effectués sur ce sujet. Les énumérer en détail ne présenterait qu'un intérêt pratique relatif. Nous avons préféré reproduire ici le tableau dressé par GIROUD et ses collaborateurs (160), car il nous a paru résumer la question d'une façon remarquablement claire. Toutefois, nous avons jugé utile de donner dans la colonne « *références* » quelques indications sur les principaux articles qui ont été consacrés à ce problème.

Le choix des auteurs qui s'est fixé sur le bœuf et le cheval s'explique fort bien. En effet, ces deux espèces ne sont pas carençables. Elles synthétisent l'acide ascorbique et, par conséquent, les valeurs trouvées sont en grande partie indépendantes de leur alimentation. Les moyennes ainsi déterminées correspondent donc au « *taux normal* ».

Au cours de leurs recherches, GIROUD et ses collaborateurs ont presque toujours utilisé la méthode de TILLMANS, qui donne une légère erreur par excès. Toutefois, comme les expérimentateurs ont le plus souvent vérifié leurs résultats analytiques par d'autres procédés de dosage (biologique, spectrographique, etc.), on peut considérer les chiffres exprimés dans le tableau XI comme très proches de la réalité.

On voit ainsi que l'acide ascorbique est répandu dans tout l'organisme. D'autre part, chaque tissu, chaque organe possède un taux caractéristique. Ces diverses constatations ont contribué à mettre en lumière les propriétés physiologiques de la vitamine C.

TABLEAU XI

D'après GIROUD, LEBLOND, RATSIMAMANGA, RABINOWICZ et DRIEUX (160).

TISSUS ET ORGANES	BŒUF		CHEVAL		RÉFÉRENCES
	Val. extr.	Moyenne	Val. extr.	Moyenne	
Tégument					
Derme	»	0,3	1,2 - 4	2,52	»
Corps muqueux	9,6 - 16	12,6	7,6 - 16,7	12,8	»
Couche cornée	»	»	»	1,3	»
Tissu pigmentaire	»	»	9 - 12	10,3	»
Glandes sébacées	»	15,4	»	»	»
Système nerveux					
Moëlle épinière	6 - 9	6,5	»	13,8	(198) (192) (217) (218)
Cerveau - substance blanche	9 - 12	10,1	10,5 - 12,8	12	(198) (192) (217) (218)
- substance grise	15 - 15,7	15,5	14,7 - 19,3	17	(198) (192) (217) (218)
- substance totale	»	16,61	16,8 - 20	19	(198) (192) (217) (218)
Couche optique	»	7,10	»	1	(198) (192) (217) (218)
Glanglion rachidien	9 - 23	15	»	»	(198) (192) (217) (218)
Glanglion sympathique	10 - 59	23,1	»	»	(198) (192) (217) (218)
Nerf rachidien	»	4	»	»	(198) (192) (217) (218)
Nerf sympathique	»	12	»	»	(198) (192) (217) (218)
Nerf optique	6,1 - 11,2	11,2	»	12	(198) (192) (217) (218)
Œil					
Sclérotique	1,2 - 2	2	»	5,5	(182) (176)
Cristallin	20,8 - 35	26,4	»	34	(220) (182) (192)
Humeur vitrée	8,7 - 10,3	8,7	11 - 20,4	11	(221)
Humeur aqueuse	17,3 - 22,4	17,3	»	28	(219) (221)
Rétine	20 - 25,2	20	»	12,8	(176)
Glande lacrymale	»	11,3	»	»	»

TABLEAU XI (Suite)

Tissus et organes	Bœuf		Cheval		Références
	Val. extr.	Moyenne	Val. extr.	Moyenne	
Glandes endocrines					
Hypophyse totale	120 - 133	126	120,4 - 151,6	136	(177) (178) (222) (223)
lobe antérieur	122,8 - 181	161,1	»	153,8	(177) (178) (222) (223)
lobe intermédiaire	179 - 223,6	198	»	»	(177) (178) (222) (223)
lobe postérieur	55 - 120	60	»	»	(177) (178) (222) (223)
lobe nerveux	53,4 - 72	61	64,7 - 65	65	(177) (178) (222) (223)
Epiphyse	20,8 - 24,5	22,7	20,7 - 52	36,9	(222)
Surrénale totale	90 - 191	133	130 - 271	197,9	(134) (178) (177) (176)
cortex	93 - 214	149	166 - 241	192	(134) (178) (177) (176)
médullaire	53 - 162	94	125 - 174,6	144,1	(134) (178) (177) (176)
Thyroïde	10 - 19,4	17	11,3 - 23,7	18,2	(178)
Parathyroïde	»	45,7	40 - 49	44	(178)
Testicule	21,3 - 40,8	30	46 - 52,2	49	(136) (138) (178)
Cellules génitales	»	31,5	»	27	»
Spermatozoïdes (épididyme)	12,3 - 27	19,6	10 - 11,5	10,75	»
Ovaire sans corps jaune	9,7 - 48	20,5	30,9 - 63,5	47	(178) (180) (192)
Corps jaune	26 - 171,6	113,9	41 - 81	73	(194) (178)
Ovaire avec corps jaune	40 - 74,4	58,8	»	»	(194) (178)
Liquide folliculaire	0,9 - 2,5	1,5	»	1,6	»
Appareil génital					
Prostate	»	20,2	6 - 17	11,9	»
Utérus total	2,5 - 12,9	7,7	»	5	»
musculeuse	»	18,3	»	5,1	»
muqueuse	»	13,7	»	7,2	»
Mamelle	»	5	»	1,8	»

TABLEAU XI (Suite)

Tissus et organes	Bœuf		Cheval		Références
	Val. extr.	Moyenne	Val. extr.	Moyenne	
Appareil digestif					
Œsophage total	»	3,4	»	2,3	(222) (223) (226) (227)
Estomac total	4 - 8,7	6,3	6,1 - 8	6,6	(222) (223) (226) (227)
muqueuse	»	»	5,4 - 10,4	7,9	(222) (223) (226) (227)
musculeuse	»	»	4,2 - 4,8	4,5	(222) (223) (226) (227)
Intestin grêle total	12,4 - 16	16	»	17,3	(222) (223) (226) (227)
muqueuse	»	18,9	»	»	(222) (223) (226) (227)
musculeuse	»	5,9	»	»	(222) (223) (226) (227)
Gros intestin total	5,9 - 16	7,3	»	6,1	(222) (223) (226) (227)
muqueuse	»	6,3	»	»	(222) (223) (226) (227)
musculeuse	»	2,2	»	»	(222) (223) (226) (227)
Foie	19,3 - 36	29	13,8 - 28,3	20,3	(138) (177)
Pancréas	7 - 11	9,3	24 - 27,8	25,9	(178)
Parotide	4,5 - 7,7	7,7	51 - 161	102,1	»
Sous maxillaire	5 - 9	6,2	10 - 15	12,5	»
Appareil urinaire					
Rein total	7,4 - 14,8	10,8	6,3 - 14,1	11	(203) (216) (217)
cortex	9,2 - 14	11,6	8,4 - 14	10,9	(203) (216) (217)
médullaire	7,6 - 8	8	7,5 - 11,8	9,9	(203) (216) (217)
Vessie totale	»	4,8	»	5,4	»
muqueuse	»	2,3	»	21,7	»
musculeuse	»	4,3	»	5,7	»
Appareil respiratoire					
Poumon	15,3 - 21,2	18,2	15,6 - 19,5	17,6	»

TABLEAU XI (Fin)

Tissus et organes	Bœuf		Cheval		Références
	Val. extr.	Moyenne	Val. extr.	Moyenne	
Appareil circulatoire					
Artère	»	2	»	»	»
Veine	»	1,3	»	»	»
Sang	»	0,2	»	0,7	(177) (228) (229)
Glanglion lymphatique	22 - 71,8	51	33 - 56	45	»
Moelle osseuse jaune	»	2,4	»	2,2	»
Moelle osseuse rouge	»	11,4	»	»	»
Rate	21,7 - 30,3	27,5	25,2 - 32,6	29,4	(178) (228)
Thymus	50 - 86	65	»	»	(178) (189)
Tissu musculaire					
Muscle squelettique	0,7 - 2	1,6	»	1,2	(138) (195) (222) (223)
cardiaque	»	3,8	2,3 - 6,1	3,3	»
lisse	»	6,3	»	6,6	»
estomac	4 - 8,7	6,3	6,1 - 8	6,6	»
intestin	»	6,2	»	»	»
vessie	»	4,3	»	5,7	»
utérus	»	18,3	»	5,1	»
Tissu conjonctif et dérivés					
Graisse cutanée	0,2 - 1	0,8	0,4 - 1,8	0,5	»
Graisse de rein	»	0,6	0,5 - 3,8	1,8	»
Tissu conj. derme	»	0,3	»	2	»
Tendon	»	1,3	»	»	»
Ligament élastique	»	1,2	»	»	»
Os	»	»	5 - 6,4	6	»
Cartilage	»	»	»	2	»
Liquide synovial	»	»	»	0,56	»

L'acide ascorbique chez l'homme

L'homme étant incapable d'effectuer la synthèse de l'acide ascorbique, les taux réalisés chez lui sont variables, puisqu'ils dépendent de l'apport exogène en vitamine C. L'alimentation habituelle est relativement pauvre en acide ascorbique, aussi les taux réalisés dans les organes humains sont, le plus souvent, très inférieurs aux teneurs normales, comme le montre le tableau XII.

Enfin, les dosages pratiqués dans les liquides biologiques (sang, liquide céphalo-rachidien et urine) sont des tests couramment employés, car ils donnent de précieuses indications sur l'état vitaminique du sujet (cf. tableaux XIII, XIV, XV et XVI).

L'acide ascorbique dans le lait (cf. tableau XVII)

Lait de vache

De nombreux auteurs ont cru que la teneur du lait de vache en vitamine C dépendait de la quantité d'acide ascorbique ingéré. Le fait que la valeur antiscorbutique du lait d'été se trouve parfois supérieure à celle du lait d'hiver semblait confirmer cette opinion. Mais on a démontré actuellement que le changement de nourriture ne provoquait pas de variations notables de la teneur du lait en acide ascorbique. Les bovidés sont capables de synthétiser la vitamine C et, par conséquent, cette dernière se maintient dans leur organisme à un taux sensiblement constant.

La cause de ces variations semble être due principalement aux fonctions physiologiques (gestation et allaitement) qui conditionnent la lactation. La production du lait est maxima dans la période qui suit le vélage. Au bout de cinq mois, elle diminue progressivement jusqu'à la prochaine parturition. La quantité d'acide ascorbique synthétisée par la vache étant constante, il en résulte que la concentration en vitamine C est plus faible pendant la période d'allaitement, où le lait est abondant.

Anceaux [232] et Ferdinand [238] estiment que le lait des vaches à l'étable est plus riche en vitamine C que celui des

vaches en pâture, bien que la nourriture d'hiver (tourteaux, foin, betteraves) soit plus pauvre en acide ascorbique que celle d'été. En effet, la forte hydratation de la nourriture d'été augmente la production de lait, ce qui diminue la concentration en vitamine C. En outre, la température, plus froide en hiver, retarde l'oxydation du facteur antiscorbutique et empêche la prolifération des agents microbiens qui peuvent favoriser cette destruction.

En résumé, comme la quantité totale d'acide ascorbique éliminée dans le lait est sensiblement constante, la teneur en vitamine dépend uniquement de la concentration, c'est-à-dire qu'elle varie en raison inverse de l'intensité de la lactation.

Par conséquent, les variations observées sont avant tout d'ordre individuel.

Lait de femme

Le lait de femme est beaucoup plus riche en acide ascorbique que le lait de vache. Sa teneur varie suivant l'époque de la lactation. Elle est maxima pendant la période colostrale, puis, au bout d'un mois, elle commence à baisser progressivement.

Bolduc [248] estime que le lait de femme ne contient pas assez de vitamine C pour satisfaire aux besoins du nourrisson.

Laits divers

Bleyer [230] a comparé la teneur en acide ascorbique de différents laits avec celle du lait de vache. La brebis donne un lait plus pauvre. La chèvre fournit un lait comparable à celui de la vache. Le lait de chamelle est deux fois plus riche en vitamine C que le lait de vache. Enfin, le lait d'ânesse aurait une teneur beaucoup plus élevée.

Conservation du lait

a) *Transport du lait.* — La teneur en vitamine du lait de vache peut diminuer très sensiblement quand cet aliment est conservé ou transporté dans des conditions défectueuses. Placé dans des récipients ouverts et exposés à la chaleur, le lait peut perdre, en quatre heures, 50 % d'acide ascor-

bique. Van Leersum [249] estime que l'on peut éviter la saturation du lait par l'oxygène en utilisant des trayeuses mécaniques et en empêchant, au cours d'un transport rapide, le ballotement du lait par le remplissage très exact des récipients refroidis par des serpentins immergés.

b) *Lait bouilli.* — Une ébullition rapide du lait n'altère pas sensiblement la vitamine C. Meulemans et de Haas [237] trouvent une perte de 30 % après une ébullition de cinq minutes dans un récipient en aluminium.

c) *Lait pasteurisé.* — Les auteurs ne sont pas d'accord sur la valeur antiscorbutique des laits pasteurisés. Simonnet estime que la perte de vitamine C ne dépasse pas 15 à 20 %. Par contre, Anceaux [232] trouve des pertes variant entre 75 et 80 %. La divergence de ces résultats provient du soin plus ou moins grand apporté à la réalisation technique de la pasteurisation. En effet, l'élévation de la température et le contact avec les parois métalliques des stérilisateurs accélère l'oxydation de la vitamine. Pour que le lait pasteurisé conserve la majeure partie de son acide ascorbique, il faudrait, d'une part, qu'il soit recueilli et transporté dans les conditions optima de conservation et, d'autre part, que la pasteurisation soit effectuée dans des récipients de verre en opérant à basse température et dans le vide.

d) *Lait conservé.* — Les laits concentrés contiennent moins d'acide ascorbique que les laits secs. On pense que la concentration étant moins rapide que la dessication, l'oxygène serait plus longtemps en contact avec la vitamine, ce qui en favoriserait la destruction. De plus, les laits concentrés se trouvent directement au contact du métal, ce qui favorise l'oxydation, tandis que les laits en poudre placés dans des sacs en papier ou en cellophane sont à l'abri de cet inconvénient.

Le lait concentré sucré est plus riche en vitamine C que le lait non sucré, car le sucre protège contre les oxydations.

Le lait homogénéisé ne contient presque plus d'acide ascorbique. En effet, le traitement mécanique qu'il subit augmente considérablement le contact avec l'oxygène de l'air et favorise ainsi l'oxydation de la vitamine.

Le lait desséché par la méthode des cylindres tournants conserve beaucoup mieux son acide ascorbique que le lait desséché par vaporisation.

Dans l'ensemble, la teneur en vitamine C du lait en poudre est légèrement supérieure à celle des laits frais de ville. Son emploi est particulièrement indiqué pour l'alimentation du nourrisson.

e) *Lait fermenté.* — L'élévation de l'acidité dans les laits fermentés semblerait devoir favoriser la conservation du principe antiscorbutique. En fait, ce facteur ne semble pas avoir une grande influence et c'est le vieillissement seul qui paraît intervenir en détruisant assez rapidement la vitamine. Au moment de la consommation, le yoghourt ne renferme pratiquement plus d'acide ascorbique.

TABLEAU XII

Homme	Taux normal théorique	Taux réalisé pratiquement	Références
Amygdales non hypertrophiées (chez l'enfant)	»	20	(181)
Amygdales hypertrophiées (chez l'adulte)	»	25	(181)
Amygdales (valeurs extrêmes)	»	10,6 - 47,6	(191)
(valeur moyenne)	34	24	(191)
Cerveau - chez le fœtus humain	»	30	(183) (184)
- chez le nourrisson	»	21	(183) (184)
- chez l'adulte	16,6	7	(197)
- chez le vieillard (70-80 ans)	»	4	(183) (184)
Cœur	3,8	2,6	(197)
Cristallin normal	26,4	31	(192)
Cristallin en cas de cataracte	»	0 - 5	(192)
Ecorce cérébrale	»	17	(193)
Ecorce du cervelet	»	26	(193)
Epiphyse	22,7	10,8	(198)
Foie - chez l'enfant	»	21	(175)
- chez l'adulte	29	7,7	(175)
- chez le vieillard	»	4	(175)
Ganglions basaux	»	16	(193)
Humeur aqueuse	17,3	12	(195)
Hypophyse	126	34,9	(195)
—	126	19,7	(197)
—	126	16,8	(183)
Moelle chez l'adulte	»	20	(184)
Ovaire, corps jaune	113,9	20	(194)
Pancréas	9,3	3,7	(197)
Poumon	18,2	5,5	(195)
—	18,2	1,7	(197)
Rate	27,5	11,5	(195)
—	27,5	15	(197)
Rein - chez l'enfant	»	7	(175)
- chez l'adulte	10,8	3,6	(197)
- chez le vieillard	»	2	(175)
Surrénale - chez l'enfant	»	48	(175)
- chez l'adulte	133	19,7	(197)
- chez le vieillard	»	7	(175)
Thymus - jusqu'à 1 an	»	31	(195)
- de 1 à 10 ans	»	19	(195)
- chez l'adulte	65	9,8	»
- entre 46 et 77 ans	»	4,6	(195)

TABLEAU XIII

Sang	Acide ascorbique **total** mgr. pour 100 cc.	Références
Sang normal	2	(77)
—	2,05	(203)
—	0,5 à 1,5	(200)
Sang - de 10 à 19 ans.....	2,18	(202)
de 20 à 29 ans.....	2,30	(202)
de 30 à 39 ans.....	1,95	(202)
de 40 à 49 ans.....	1,90	(202)
de 50 à 59 ans.....	2,18	(202)
de 60 à 69 ans.....	2,26	(202)
de 70 à 79 ans.....	2,90	(202)
Globules blancs.....	0,86 à 1,48	(204)
Sérum	2 à 3	(184)
—	0,14 à 1,21	(206)

TABLEAU XIV

Sang	Acide ascorbique **réduit** mgr. pour 100 cc.	Références
Sang normal	0,4	(199)
—	0,5	(203)
—	0,7	(196)
—	0,1 à 0,8	(201)
Sang (sujet saturé en vitamine C).....	1,2 à 1,7	(201)
Sang (nourrisson allaité au sein les premiers mois)	0,9	(196)

TABLEAU XV

Liquide céphalo-rachidien	Mgr pour 100 cc.	Références
Liquide C. R. — Au-dessous de 10 ans.....	1,9	(183) (184)
entre 20 et 35 ans.....	1,7	(183) (184)
entre 35 et 60 ans.....	0,9	(183) (184)
au-dessus de 60 ans.....	0,4	(183) (184)
Liquide C. R. normal	0,8 à 1,4	(231)
Liquide C. R. — Chez le prématuré du 8e mois	2,7	(208)
chez le nouveau-né à terme..	1,4	(208)
chez le nourrisson.....	1,3	(208)
chez l'enfant.....	0,7	(208)
chez l'adulte.....	0,5 à 0,7	(208)
chez le vieillard.....	0,3 à 0,4	(208)

TABLEAU XVI

Urine	Dichloro-phénol indophénol	Bleu de méthylène	Réactif de Bezssonoff	Corrigés d'après l'action de l'ascorbinase	Références
Elimination totale (quotidienne) :					
Régime riche.....	45	14,94	»	11,85	(209)
Régime hiver normal.	33,27	10,18	»	5,52	(209)
Quantité par litre (moyenne).....	20 à 25	7 à 10	30	4 à 6	»

TABLEAU XVII

Laits	Minima mgr °/₀ cc.	Maxima mgr °/₀ cc.	Moyenne pratique	Références
Colostrum de vache	2,62	4,5		(232)
Lait de vache	0,48	1,45	0,87	(234)
—	0,92	2,84	1,66	(235)
—	0,77	2,78	»	(236)
—	0,52	2,6	»	(232)
—	1,2	2,1	1,5	(237)
—	2	2,5	»	(230)
Lait de vache - printemps	0,58	1,68	1,1	(238)
- été	1,7	3,8	2,5	(233) (246) (247)
- automne	2	2,8	2	(247)
- hiver	0,85	1,8	1,3	(238)
Beurre	»	»	0	»
Lait de vache pasteurisé	0,4	1	»	(236)
Lait de vache pasteurisé selon la saison	0,7	2,8	»	(239)
Babeurre sans farine ni sucre	»	»	1,1	(232)
avec farine et sucre	»	»	1	(232)
Babeurre partiellement écrémé non sucré	»	»	0,92	(232)
Babeurre partiellement écrémé et sucré	»	»	0,82	(232)
Lait concentré sucré	0,4	0,75	0,55	(232)
Lait concentré irradié et sucré	»	0,7	»	(232)
Lait concentré homogénéisé et non sucré	»	»	0,2	(232)
Lait sec complet	»	»	1,17	(232)
demi-écrémé	»	»	1,15	(232)
écrémé	»	»	1,12	(232)
Lait fermenté (yoghourt et anal.)	»	»	0	(232)
Lait de buffle	»	»	1	(172)
Lait de chèvre	»	»	0,9	(172)
—	»	»	1,4	(241)
—	2	2,6	»	(232)
Colostrum de femme	»	»	5,32	(239) (240)
Colostrum de femme après le premier mois	4	5	»	(230)
Lait de femme - hiver	»	»	4,4	(238)
- printemps	»	»	2,7	(238)
- été	5,6	6	»	(134)
Lait de femme - valeur annuelle moyenne - Latins	»	»	3	(239)

TABLEAU XVII (Fin)

Laits	Minima mgr °/₀ cc.	Maxima mgr °/₀ cc.	Moyenne pratique	Références
Lait de femme - valeur annuelle moyenne - Hindous.....	»	»	3,5	(172)
Lait de femme - valeur annuelle moyenne - Japonais.....	»	»	3,5	(240)
Lait de femme	1,26	5,04	»	(238)
—	4	7	»	(243)
—	3,3	4,9	»	(244)
—	0,5	2,2	»	(245)
—	0,4	2,8	1,77	(232)

CHAPITRE VII

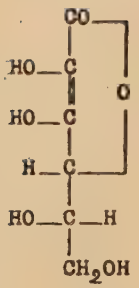
Propriétés biochimiques et physiologiques

Structure et activité

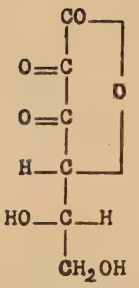
L'étude des composés voisins de l'acide ascorbique semble avoir permis de déterminer à quelle structure chimique il convenait d'attribuer l'activité physiologique de la vitamine C.

Parmi les composés *physiologiquement actifs* nous citerons :

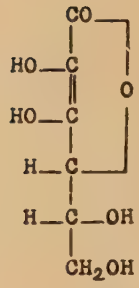
Acide l ascorbique [116], activité intégrale ;
Acide déhydroascorbique [116], activité sensiblement intégrale ;
Acide l rhamno-ascorbique [121], environ 1/5 de l'activité de la vitamine C ;
Acide iso-ascorbique [122], [123], environ 1/20 de l'activité de la vitamine C ;
Acide l gluco-ascorbique [122], environ 1/40 de l'activité de la vitamine C ;
Acide l fuco-ascorbique ;
Acide 5 désoxy l ascorbique [124] ;
Acide 6 désoxy l ascorbique [125] ;
Céto 2 gluconate de méthyle [126], [127].



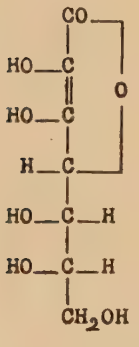
acide l-ascorbique



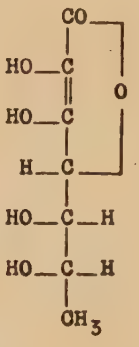
acide déhydroascorbique



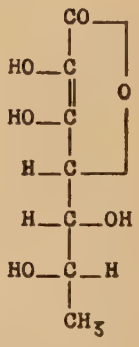
acide iso-ascorbique ou
d arabo-ascorbique



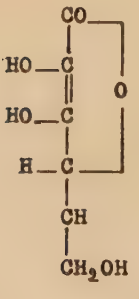
acide l-gluco-ascorbique



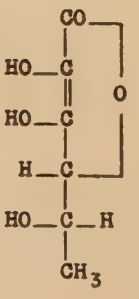
acide l-rhamno-ascorbique



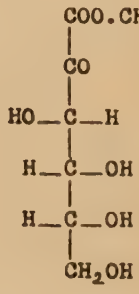
acide l-fuco-ascorbiq



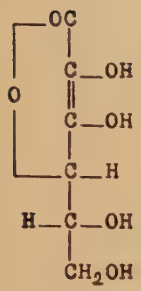
acide 5 désoxy l-ascorbique



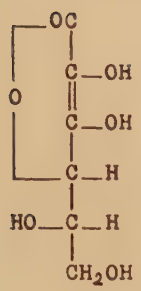
acide 6 désoxy l-ascorbique



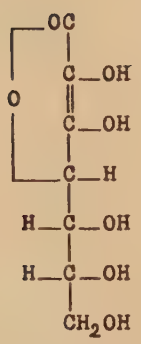
céto 2 gluconate de méth



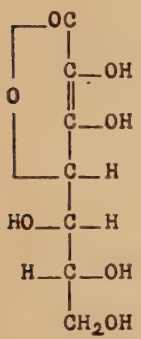
acide d-ascorbique



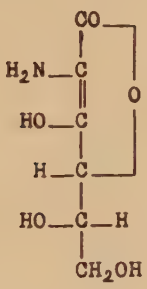
acide l-arabo-ascorbique



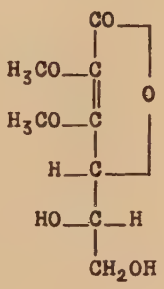
acide d-gluco-ascorbique



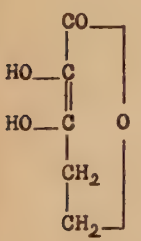
acide d-galacto-ascorbique



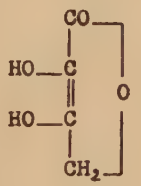
acide l-ascorbaminique



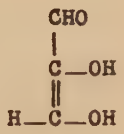
acide 2-3 diméthyl l-ascorbique



acide réductique



acide oxytétronique



Réductone
ou hydroxyméthylglyoxal

Parmi les composés *physiologiquement inactifs*, nous signalerons :

Acide d ascorbique ;
Acide l arabo-ascorbique ;
Acide d gluco-ascorbique [122] ;
Acide d galacto-ascorbique [122] ;
Acide l ascorbaminique [128], [129] ;
Acide 2-3 diméthyl-ascorbique [130] ;
Acide réductique ;
Acide oxytétronique ;
Hydroxyméthylgyoxal ou réductone.

Ces listes ne sont d'ailleurs pas complètes. En outre, il ne faut pas oublier de mentionner le produit d'oxydation intermédiaire entre l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique, la (vitamine C — H) indiqué par Bezssonoff et Mme Woloszyn [76], [81], [82]. L'existence de ce composé d'oxydation nécessitant un atome d'oxygène pour deux molécules d'acide ascorbique est également signalé par Ku [131] et par Griasnov [132]. D'après ces auteurs, le produit d'oxydation complète ne posséderait plus la propriété vitaminique, mais ce serait le produit correspondant à la demi-oxydation (vitamine C — H) qui présenterait cette propriété.

L'examen des composés analogues à l'acide ascorbique permet de faire deux constatations :

a) Le comportement de l'acide ascorbique et de ses analogues au point de vue de l'absorption spectrographique et des propriétés chimiques dépend de la structure diénolique.

A cet égard, la comparaison de la réductone avec l'acide ascorbique est caractéristique. La réductone (hydroxyméthylglyoxal) est sans doute la substance la plus simple qui possède la structure diénolique. Elle se forme par l'action des alcalis sur les hydrates de carbone. La réductone ressemble à l'acide ascorbique par son absorption lumineuse et par la forte acidité qu'elle accuse malgré l'absence de carboxyle.

Des constatations analogues peuvent être faites avec les acides tétroniques substitués, produits résultant du développement du Poenicillium Charlerii dans le milieu glucosique de Czapek-Dox. La structure de ces acides tétroniques, établie par Clutterbuck, Raistrick et Reuter [133], a permis de mettre en évidence la parenté de leurs formules avec celle de l'acide ascorbique.

Mais parmi les différents composés présentant une ana-

logie évidente avec l'acide ascorbique, beaucoup sont totalement dépourvus d'activité physiologique. Pour indispensable qu'elle soit, la présence de la structure diénolique et annulaire est donc insuffisante pour déterminer à elle seule le pouvoir vitaminique.

b) Il faut conclure, avec REICHSTEIN (121), que le pouvoir vitaminique de ces composés se manifeste seulement quand la disposition stérique du groupement lactone est « d », et cela quelle que soit la série « d » ou « l » des dérivés glucidiques à laquelle appartient la molécule.

En d'autres termes, et pour éviter toute confusion, on peut dire qu'il y a pouvoir vitaminique quand le quatrième atome de carbone est (+). Il ne doit être ni (—), ni symétrique, comme c'est le cas pour l'acide oxytétronique.

Par contre, l'inactivité des acides l ascorbaminique et 2,3 diméthyl l ascorbique provient du fait que la fonction diénolique qui, comme l'a montré SZENT-GYÖRGYI, doit demeurer libre, se trouve bloquée par des radicaux — NH_2 ou — CH_3.

Quant au céto 2 gluconate de méthyle, on peut le considérer comme une provitamine. En effet, par saponification, il donne une lactone identique à l'acide isoascorbique qui, par énolisation, conduirait à la vitamine C.

Potentiel d'oxydo-réduction

Les travaux de WURMSER et RAPKINE (600), WURMSER et LOUREIRO (56), (74), REISS, NORDMANN et BEZSSONOFF (601), (602) ont montré que le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire était en relation avec certains dérivés glucidiques et notamment avec l'acide ascorbique.

De nombreuses observations viennent, en effet, à l'appui de cette théorie.

Ainsi, le cristallin qui a un potentiel de + 0,087 volts (rH 18), à l'état normal, voit celui-ci s'élever à + 0,166 volts (rH 20,6), quand l'acide ascorbique disparaît au cours de la cataracte.

De même, chez le cobaye soumis au régime RANDOIN additionné de 1 à 4 mgr. de vitamine C, le potentiel est environ de + 0,113 volts, alors que si l'on supprime l'acide ascorbique le potentiel augmente à + 0,125, puis à + 0,145 volts.

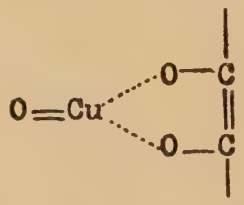
Comme le montre ces expériences, la vitamine C semble donc exercer une action importante sur le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire et, par suite, sur d'autres phénomènes biochimiques.

Rôle de l'acide ascorbique dans les oxydations et dans divers processus diastasiques

Szent-Gyorgyi (250) a montré qu'il existait dans les tissus végétaux (les feuilles de choux en particulier) plusieurs systèmes enzymatiques assurant les dernières étapes de la dégradation oxydative des métabolites, et principalement l'oxydation de l'hydrogène.

L'acide ascorbique constitue l'agent principal de l'un de ces systèmes enzymatiques. Il existe, en effet, à côté de la vitamine C, une oxydase capable d'oxyder l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique.

D'après Szent-Gyorgyi, cette diastase serait un complexe métallo-protéique, probablement une protéine du cuivre. Agissant sous la forme ionisée, le mécanisme de l'oxydation de la vitamine C est le suivant : l'anion de l'acide ascorbique s'unit au métal de l'oxydase en formant un complexe dans lequel le métal se trouve activé et rendu capable de s'unir avec l'oxygène.



L'oxydation propre se résume donc en un simple transfert d'électrons de l'acide ascorbique au métal et du métal à l'oxygène.

Pour que la molécule organique soit capable de jouer ce rôle, il faut qu'elle possède une structure diénolique.

Mais le nombre des valences coordinatives du cuivre est tel que le résultat de l'oxydation des deux hydrogènes d'une molécule d'acide ascorbique par l'oxygène de l'air est du peroxyde d'hydrogène $H_2 O_2$, c'est-à-dire qu'il faut deux atomes d'oxygène pour une molécule d'acide ascorbique. Là encore, Szent-Gyorgyi a montré qu'il existe dans les cellules qui utilisent l'acide ascorbique comme système res-

piratoire une peroxydase et un donateur d'hydrogène. La peroxydase décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Ce dernier agit sur le donateur d'hydrogène, qui est une substance jaune de structure benzopyrane du groupe des flavones et la transforme en quinol. C'est le quinol ainsi produit qui oxyde la seconde molécule d'acide ascorbique.

On peut schématiser ainsi le mécanisme de ces diverses réactions :

O_2 — acide ascorbique oxydase ← acide ascorbique ← 2 H

↓

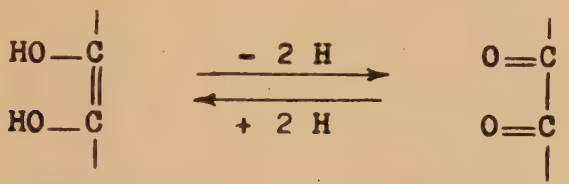
H_2O_2 ← peroxydase ← flavone ← acide ascorbique ← 2 H

↓

$2\,H_2O$

Il faut noter d'ailleurs que l'étude de cette flavone a conduit à la découverte de la vitamine P.

En résumé, par ses propriétés d'oxydation reversible, la vitamine C joue un rôle de premier plan comme transporteur d'hydrogène :



Depuis longtemps, on avait remarqué la relation qui existait entre l'acide ascorbique et les phénomènes d'oxydation.

Höjer [266], en effet, avait constaté que la consommation en oxygène des tissus d'un animal scorbutique était très diminuée. D'autre part, Harrisson [267] a montré qu'en ajoutant de l'acide ascorbique au tissu hépatique d'un animal carencé, on détermine une augmentation de la consommation d'oxygène variant de 5 à 57 %. Enfin, Quastel et Wheatley [268] ont noté que l'addition d'acide ascorbique dans des tranches de foie augmentait l'oxydation des acides gras.

Szent-Gyorgyi [251] avait démontré depuis plusieurs années l'existence d'oxydases susceptibles d'oxyder spécifiquement l'acide ascorbique. Il avait isolé de telles diastases qu'il nommait hexoxydases, de la feuille de chou et de la cortico-

surrénale. Plus tard, Tauber et Kleiner [252] ont également isolé une oxydase spécifique à partir du cucurbita maxima.

On retrouve des oxydases analogues dans d'autres tissus. C'est ainsi que Wachholder et ses collaborateurs [253] ont étudié les oxydases musculaires. Celles du muscle cardiaque semblent être plus actives que toutes les autres.

Inversement d'ailleurs, on trouve des diastases qui sont capables d'assurer la réduction de l'acide déhydroascorbique. En effet, l'acide déhydroascorbique est réduit par de nombreux tissus. D'après Schultze [254], ce fait serait dû au glutathion ou aux substances à fonction — SH.

De leur côté, Roe et Barnum [255] ont trouvé dans le sang une diastase capable de réduire l'acide déhydroascorbique.

Lemberg [256] a mis en lumière le rôle de l'acide ascorbique dans l'oxydation des hématochromogènes. Le ferri-hémochromogène oxyde l'acide ascorbique, tandis que le ferro-chromogène est oxydé par l'oxygène moléculaire.

L'intervention de l'acide ascorbique dans divers processus diastasiques, soit comme catalyseur, soit comme inhibiteur, semble être bien établie. Toutefois, comme le fait remarquer King [257], ces expériences sont délicates, car il est difficile de travailler sur des diastases pures et des traces de métaux peuvent intervenir. En effet, l'acide ascorbique peut modifier des systèmes comme $Cu^{++} \longrightarrow Cu^{+}$, $Fe^{+++} \longrightarrow Fe^{++}$, etc., qui, à leur tour, modifient considérablement les réactions.

Parfois aussi, l'acide ascorbique joue le rôle d'un complément indispensable. Il constitue alors une co-diastase formant avec l'apo-diastase, l'holo-diastase active.

Von Euler, Karrer et Zehender [258] ont montré que l'acide ascorbique augmente l'activité de la papaïnase (ou cathepsine), soit en inhibant des métaux inhibiteurs, soit en formant un système d'oxydo-réduction. D'après Purr [259], il activerait également l'amylase animale.

Martison et ses collaborateurs [260] ont constaté que l'addition d'acide ascorbique à une préparation de foie modifie la vitesse de la protéolyse. De leur côté, Pantschenko, Jurewicz et Kraut [261] ont obtenu des préparations d'esterases hépatiques qui étaient capables de réduire l'acide ascorbique. Ce dernier jouerait donc là le rôle d'une co-esterase qui, en s'unissant à l'apo-esterase, formerait une holo-diastase. Toutefois, comme les quantités d'acide ascorbique nécessaires pour réactiver l'apo-esterase sont nettement

supérieures à celles que l'on trouve dans les préparations d'esterases actives, on suppose que l'acide ascorbique ne s'unit pas directement avec l'apo-esterase, mais seulement après transformation.

Selon Rubin et Artzichovzskaja (262), l'acide ascorbique active l'invertine dans les cellules vivantes. D'après Arloing et ses collaborateurs (263), (264), il est sans action sur la fermentation des levures alors qu'il active la fermentation par le bacille Coli, mais non sa croissance. Par contre, le complexe ascorbo-cuivrique inhibe la fermentation et la croissance du bacille Coli.

L'acide ascorbique joue également un rôle dans la décarboxylation des acides aminés. Holtz et Heise (265) ont constaté, en effet,, qu'il catalysait la réaction histidine $\longrightarrow CO_2$ + histamine provoquée par les tissus du foie ou du rein. Stotz (269) a signalé d'ailleurs que les tissus du foie exercent une action inhibitrice sur l'oxydation de l'acide ascorbique par l'indophénol.

Enfin Holtz (342) et Abderhalden (343) attribuent à la vitamine C les propriétés d'une désaminase, c'est-à-dire d'une diastase agissant sur les acides aminés (notamment l'histidine et l'histamine), pour en séparer l'ammoniaque. Cette action mériterait d'être approfondie, car elle permettrait peut-être d'expliquer le pouvoir anti-choc de l'acide ascorbique.

Ce bref aperçu, qui montre l'intervention constante de l'acide ascorbique dans divers phénomènes biochimiques, permet de comprendre le rôle important que joue la vitamine C dans la vie cellulaire.

Formes de l'acide ascorbique dans l'organisme

L'acide ascorbique existerait dans l'organisme sous plusieurs formes. La forme réduite est la plus importante, la forme oxydée ne constituerait que le 1/10e ou le 1/20e de la première. D'après Martini et Bonsignore (214), le rapport acide déhydroascorbique / acide ascorbique augmenterait considérablement au cours de l'avitaminose C. Par contre, Kellie et Zilva (215), ainsi que van Eekelen (216) prétendent que cette forme oxydée n'existerait pas, tout au moins dans le sang. En effet, d'une part, cette forme oxydée que l'on régénère par H_2S ne diminue pas avec un régime carencé

et, d'autre part, les examens spectrophotométriques ne correspondent pas aux dosages. Il est donc vraisemblable que la réduction par H_2 S donne naissance à des substances réductrices diverses qui ont été confondues avec l'acide ascorbique.

Selon Roe (217), seule la forme réduite existerait. Cette dernière conclusion semble d'ailleurs un peu trop absolue et, à notre avis, la question n'est pas encore pleinement élucidée.

Enfin, on envisage aussi l'existence d'une forme combinée. Bezssonoff (206) a constaté, en effet, que l'hydrolyse acide des extraits obtenus provoque une augmentation de l'acide ascorbique dosable. Ces faits ont été confirmés par Mac Henry et Graham (152) ainsi que par Guha et Pal (153).

Répartition

Comme nous l'avons vu dans un chapitre précédent, l'acide ascorbique existe à la fois dans le règne végétal et dans le règne animal.

Les nombreuses recherches effectuées dans ce domaine ont permis de préciser la teneur en vitamine C des différents tissus et organes animaux. Par des procédés histochimiques au nitrate d'argent, Giroud et Leblond (115), ainsi que Bourne (271), ont pu observer dans la cellule même des réactions localisées à certains organites (mitochondries, appareil de Golgi).

L'examen des tableaux VI, VII, VIII et XI (cf. chapitre « *Répartition* ») nous montre que l'acide ascorbique se trouve dans tous les tissus et dans toutes les cellules de l'organisme. De plus, il présente une distribution très spécifique et chaque organe, chaque tissu possède un taux caractéristique ou *taux normal*. Ce taux n'est pas absolument fixe. Il varie quelque peu, mais ses oscillations autour d'une moyenne sont assez limitées.

Par contre, les variations d'un organe à l'autre peuvent être très accusées. En cela, il se distingue très nettement du glutathion dont la répartition est beaucoup moins différenciée, comme le montre le tableau suivant (chiffres empruntés à Giroud et ses collaborateurs (160) pour l'acide ascorbique, et à Binet et Weller (271) pour le glutathion).

	Surrénale	Foie	Pancréas	Thyroïde	Rate	Cœur	Muscle
Acide ascorbique, en mgr. pour 100 gr....	128	27	9,3	11	20,5	3,8	1,1
Glutathion réduit, en mgr. pour 100 gr....	111,68	171,13	125,26	88,13	120,02	76,6	37,15
Glutathion total, en mgr. pour 100 gr....	114,98	186,14	132,61	91,58	133,25	92,31	49,24

On ne peut manquer d'établir un rapport entre la répartition élective de l'acide ascorbique dans certains organes et leurs propriétés physiologiques.

On a vu que le tissu musculaire est relativement pauvre en vitamine C, mais on remarquera cependant que sa teneur varie suivant les types fonctionnels et structuraux. Le muscle strié le plus riche est le muscle cardiaque, puis viennent les muscles squelettiques toniques et enfin les muscles non toniques. Il y a donc une relation avec leur teneur en sarcoplasma, ce qui correspond avec leur mode d'activité. Il faut noter également que l'intestin grêle est la partie la plus riche du tube digestif. Cette richesse ne provient pas de l'apport en vitamine, mais elle correspond au rôle d'activateur diastasique de l'acide ascorbique.

Les relations entre l'acide ascorbique et les fonctions endocriniennes sont particulièrement remarquables. C'est parmi les glandes à sécrétion interne que l'on trouve les plus fortes concentrations en acide ascorbique. Il semble donc que la vitamine C joue un rôle dans l'activité hormonale de ces glandes. A cet égard, l'étude de l'ovaire est particulièrement suggestive. On peut, en effet, observer dans celui-ci une superposition entre la teneur en acide ascorbique de la cellule ovarienne et son activité hormonale. Histochimiquement, la cellule folliculeuse ne donne pas la réaction de l'acide ascorbique, mais, après s'être transformé en cellule lutéinique, elle donne, au contraire, une réaction fortement positive [272]. Chimiquement, la cellule folliculeuse n'a pu être dosée directement, mais Glick et Biskind [273] ont montré que des tumeurs ovariennes secrétant la folliculine sont pauvres en vitamine C. Enfin, de nombreux auteurs

(194), (223), (274) ont constaté que la jeune cellule lutéinique n'est pas très riche au début, mais que sa teneur augmente au cours de son développement pour régresser par la suite. Le taux maxima est atteint pour la période d'épanouissement morphologique et physiologique. Il y a donc une corrélation évidente entre la teneur en acide ascorbique et les propriétés fonctionnelles de cette cellule ovarienne. La sécrétion de la progestine correspond à une concentration élevée de l'acide ascorbique cellulaire. Par conséquent, il semble s'agir là d'une relation physiologique nécessaire. D'ailleurs, au cours des états de carence ou de précarence, on a pu observer des troubles (stérilité, avortement) parfaitement explicables par la déficience fonctionnelle du corps jaune (275), (276), (277). Cette interprétation se trouve confirmée par le fait que ces troubles ne se développent chez le cobaye qu'au début de la gestation, c'est-à-dire à la seule période où le corps jaune est fonctionnel chez cette espèce.

De tout ceci, on peut conclure que les fortes concentrations en vitamine dans le tissu lutéinique sont nécessaires à la production normale de la progestine.

On a pu observer des faits analogues dans le fonctionnement de la surrénale.

Par conséquent, le rôle synergique de l'acide ascorbique dans la secrétion hormonale semble être bien établie.

Métabolisme de l'acide ascorbique

Origine chez l'organisme non carençable

La plupart des organismes animaux étant capables de synthétiser l'acide ascorbique, l'apport exogène de vitamine C n'a pas grande importance. D'après Mosonyi (283), une alimentation riche en principe antiscorbutique peut déterminer une petite élévation (10 %) de la teneur des organes, mais, dans l'ensemble, le taux normal est indépendant de l'alimentation.

La faculté de synthèse des diverses espèces a été amplement démontrée. Le rat supporte parfaitement un régime carencé. On peut, en outre, constater que son foie reste doué de propriétés antiscorbutiques (278), (279). Bien que l'œuf ne contienne pas de vitamine, le foie des jeunes poulets soumis au régime carencé renferme de l'acide ascorbique (280).

Wollman et ses collaborateurs (281) ont montré que les invertébrés synthétisaient la vitamine C. D'ailleurs, en constatant la stabilité du taux de l'acide ascorbique quel que soit le régime alimentaire, on doit admettre avec Giroud (282) que la presque totalité des espèces est capable de réaliser la synthèse de la vitamine C.

Dans le règne végétal, plusieurs observations permettent de supposer que cette synthèse s'opère à partir des sucres tissulaires. Ray (285) a montré qu'en enlevant leurs cotylédons à des plantules, on arrête le développement et on abaisse le taux de vitamine. Mais si l'on fournit à la plantule différents sucres, le développement reprend et le germe s'enrichit en acide ascorbique. Parmi ces sucres, c'est le mannose qui favorise le plus la production de vitamine. D'autre part, Ghosh et Guha (155), (284) ont extrait du Phaseolus mungo un système fermentaire qui permet de transformer le mannose en acide ascorbique.

La synthèse chimique de la vitamine C, à partir du d glucose, doit évidemment être rapprochée de ces faits. Enfin, Mentzer (319) a montré que la présence d'oxygène était nécessaire à la production d'acide ascorbique au cours de la germination.

On a pensé que dans le règne animal un sucre serait également à l'origine de cette synthèse. Toutefois, les expériences tentées pour confirmer cette hypothèse se sont montrées assez contradictoires.

De Caro et Rovida (290) attribuent cette synthèse à l'action des surrénales, car l'injection d'extrait cortical de surrénale provoque chez le cobaye une hausse de la teneur du foie en acide ascorbique et en glutathion. De même, Lucke (291) a montré que la croissance du chat surrénalectomisé ne s'arrête pas complètement si on lui donne de la vitamine C. Par contre, d'après Kurihara (292), l'ablation des surrénales chez le lapin ne déterminerait pas de changement notable de la teneur des organes en acide ascorbique. Selon Ghosh et Guha (155) une injection de glucose et de mannose provoquerait une augmentation de l'acide ascorbique tissulaire. Suivant ces auteurs, la synthèse de la vitamine C aux dépens du glucose ou du mannose peut être effectuée *in vitro* par des tissus de foie. Von Euler conteste cette synthèse, mais, d'après Guha (288) cela proviendrait du fait que cette réaction

n'a lieu qu'en présence de l'air et non dans une atmosphère d'azote. Cependant, WIDENBAUER et KOSCHORECK [295] ont pu réaliser cette expérience avec des coupes d'intestin grêle de souris et de rats, mais non avec des coupes de foie. Les travaux de KLEINER et TAUBER [286], LAPORTA et RINALDI [287], MENTZER et URBAIN [289] n'ont pas confirmé ces résultats.

En tout cas, il est vraisemblable que la synthèse de l'acide ascorbique n'est pas localisée dans un organe particulier, mais qu'elle s'effectue dans tous les tissus.

ORIGINE CHEZ L'ORGANISME CARENÇABLE

Parmi les rares organismes qui ne peuvent effectuer la synthèse de l'acide ascorbique (homme, singe, cobaye), l'apport exogène de la vitamine est essentiel. C'est dans son alimentation, surtout en légumes frais et en fruits, que l'homme doit trouver sa ration indispensable en principe antiscorbutique.

Toutefois, ROHMER, BEZSSONOFF et STOERR [208], [293] ont démontré que l'organisme du nourrisson synthétise l'acide ascorbique. En effet, ils ont constaté chez de nombreux nourrissons que la teneur en vitamine C du liquide céphalo-rachidien, qui était tombée très bas durant les maladies, était remontée à des valeurs normales après la guérison, malgré une alimentation pauvre en vitamine C ou même entièrement privée de ce facteur (babeurre). Ces faits ne peuvent s'expliquer que par une synthèse de l'acide ascorbique. Celle-ci atteint un point culminant au quatrième mois fœtal. Elle demeure très active chez le prématuré et chez le nouveau-né, reste suffisante pendant la première année puis devient négligeable chez l'enfant plus âgé, bien que certaines observations [296] semblent montrer qu'elle peut encore exister à l'âge adulte.

Il s'agit d'ailleurs vraisemblablement d'un phénomène plus général, car les expériences de WACHHOLDER [297] fournissent la preuve que les tissus des animaux carençables (cobaye) sont capables de faire la synthèse de la vitamine C.

Ces constatations nous permettent de penser que la distinction entre les espèces carençables et non carençables ne doit pas être considérée comme absolue.

Fixation et protection

Quelle que soit son origine, l'acide ascorbique se localise électivement, comme le montre les tableaux de la répartition (cf. chapitre précédent).

Par des injections intraveineuses d'acide ascorbique, de Caro [298], ainsi que Giroud et ses collaborateurs [299], ont montré que les organes qui sont normalement les plus riches se chargent le plus rapidement, ce qui confirme bien l'électivité du pouvoir de fixation des divers tissus. On peut d'ailleurs réaliser la même expérience *in vitro* en plongeant des fragments de différents organes dans une solution de vitamine C.

De Caro et Giani [300], ainsi que Mawson [301], ont montré que la protection dans les tissus de l'acide ascorbique contre l'oxydation était réalisée par diverses substances inhibitrices comme l'acide adénylique, le glutathion et la cystéine. Il est vraisemblable que dans le règne végétal les caroténoïdes jouent un rôle analogue.

La cadavérisation n'amène que lentement la disparition de l'acide ascorbique, et Mouriquand [302] estime qu'au bout de vingt-quatre heures la diminution du taux en acide ascorbique ne dépasse pas 25 %. Ce fait doit être attribué à l'existence de ces substances inhibitrices qui confèrent à l'acide ascorbique une stabilité relative même après la mort.

Catabolisme

L'évolution de l'acide ascorbique dépend de nombreux facteurs et en particulier de l'activité hormonale. Svirbely [303], Mosonyi [308], Nespor [305], Plaut et Bulow [306], Thaddea et Runne [307] ont constaté que l'administration d'hormone thyroïdienne provoquait une baisse des taux d'acide ascorbique. D'après Mosonyi [304], les hormones génitales (folliculine et hormone mâle) font également diminuer la teneur en acide ascorbique du foie et des surrénales. Székessy [309] signale que l'administration simultanée d'acide ascorbique et de progynon B provoque la diminution du taux

de l'hémoglobine et du nombre des érythrocytes, tandis que l'administration non simultanée de ces deux corps n'a que peu d'action. KASAHARA [310] a observé un phénomène analogue : l'administration simultanée d'acide ascorbique et d'adrénaline (pour le cobaye 20 mgr. d'acide ascorbique et 1 γ d'adrénaline) provoque une forte hypertension, tandis que, injectés séparément et aux mêmes doses, ces substances ne produisent aucune action.

En général, le taux d'acide ascorbique diffère suivant le sexe. Il est toujours plus élevé chez la femelle que chez le mâle.

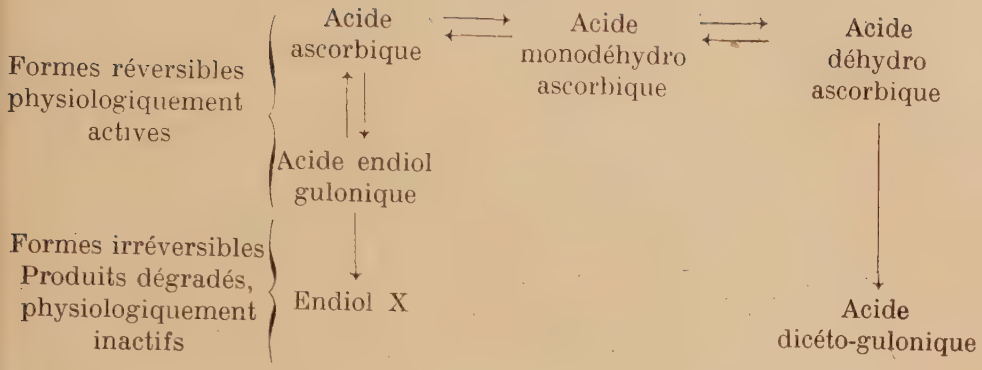
L'évolution de la vitamine C est également fonction de l'activité de certains organes. RATSIMAMANGA [311] signale l'abaissement du taux dans la surrénale au cours du travail. Cette diminution résulte non seulement de l'oxydation réversible, mais aussi d'une destruction réelle de l'acide ascorbique.

Les maladies infectieuses et les intoxications provoquent également une diminution de l'acide ascorbique [312], [313], [314], [315].

Le mécanisme de la transformation et de la destruction de la vitamine C dans l'organisme est encore mal connu. Toutefois, il est vraisemblable que cette évolution s'effectue à partir de l'acide déhydroascorbique, dont l'instabilité *in vitro* est bien démontrée.

Chez les organismes carençables, cette destruction de l'acide ascorbique varie suivant les espèces et suivant les conditions. WIDENBAUER [316], en se basant sur la différence entre l'apport et l'élimination, trouve chez l'homme une perte de 0,5 mgr. par kilogramme.

ROHMER, BEZSSONOFF et Mme WOLOSZYN [208] [317] [318] ont particulièrement étudié le processus de la dégradation de la vitamine C dans l'organisme. Ces recherches ont permis de mettre en évidence plusieurs composés et en particulier l'endiol X (H_2 COH. H COH. H COH. COH : COH. COOH) que l'on trouve dans l'urine. L'existence de l'acide endiol gulonique prévue par MICHEEL [42] et REICHSTEIN [38] est actuellement démontrée par les travaux de BALL [73], de HEINTZ [320] et de BEZSSONOFF [321]. Le tableau suivant résume l'état actuel de la question :



ELIMINATION

Normalement, l'acide ascorbique est éliminé par l'urine. En raison de la diversité des méthodes de dosages employées, les auteurs ne sont pas toujours d'accord sur la quantité excrétée. Chez l'homme elle serait de 20 à 25 mgr. par litre (procédé TILLMANS). Par la méthode au bleu de méthylène qui est plus spécifique on trouverait seulement de 7 à 10 mgr. par litre. Ces derniers chiffres devraient même être réduits (4 à 6 mgr. par litre) si l'on dose après oxydation spécifique par l'oxydase. Ces écarts sont dûs vraisemblablement à la présence d'autres corps réducteurs.

Cette élimination dépend de la concentration de l'acide ascorbique dans le sang. D'après BAUMANN (79) l'excrétion n'apparaîtrait qu'à partir d'un taux sanguin de 10 mgr. par litre. L'absorption de vitamine C, surtout par voie intra-veineuse provoque une augmentation rapide du taux d'acide ascorbique dans l'urine.

L'élimination n'est pas uniforme au cours de la journée. Environ trois heures après les repas on peut noter un accroissement assez sensible. De plus elle varie suivant les besoins de l'organisme. C'est ainsi qu'elle diminue au cours des maladies fébriles. Le dosage de la vitamine C dans l'urine permet donc d'apprécier l'état vitaminique de l'organisme.

D'après Leblond, le mécanisme de cette élimination serait à rapprocher de celui des sucres.

L'acide ascorbique est également secrété avec la bile, mais sous cette forme il est résorbé. Enfin la lactation peut inter-

venir puisque l'on retrouve près de 30 mgr. de vitamine C par litre dans le lait de femme.

Propriétés physiologiques

L'acide ascorbique, administré à la dose quotidienne de 1 mgr. à un cobaye de 500 gr. soumis au régime scorbutigène empêche totalement l'apparition des symptômes de la maladie.

Chez l'homme, l'injection intra-veineuse de 300 mgr. d'acide ascorbique provoque une hypoglycémie marquée (322). Billing (323) a montré que sur le cœur isolé et perfusé il agit en augmentant le travail de 10 à 15 % quand le liquide circulant contient 1 mgr. 0/00 d'acide ascorbique. Si la concentration dépasse 10 mgr 0/00 on constate des phénomènes d'arythmie. A des concentrations assez fortes, l'acide ascorbique augmente le tonus des muscles lisses et stimule les mouvements peristaltiques, tandis qu'il diminue la contractibilité et la sensibilité des muscles striés. Il dilate les vaisseaux du cœur, des reins et des poumons alors qu'il contracte ceux de la peau et des muscles. L'action hypertensive de l'acide ascorbique est dûe à l'excitation cardiaque qu'il provoque. Le centre respiratoire est d'abord stimulé, puis ensuite déprimé.

L'acide ascorbique n'agit pas sur la cholesterolémie. Il diminue le volume du sang circulant, produit une chute de température de 0,5°, exerce une faible action diurétique, augmente la réserve alcaline et ralentit le rhytme cardiaque. Ces diverses manifestations montrent qu'il se comporte comme un vagotonique (324) (325). De fortes doses d'acide ascorbique sont même susceptibles d'arrêter totalement le cœur de grenouille, mais le calcium peut ranimer l'organe ainsi arrêté. Il neutralise les effets toxiques de la thyroxime (326) (327). Il inhibe l'action glycogénolytique de l'hormone thyroïdienne et augmente la réserve en glycogène du foie en favorisant la transformation du glucose en glycogène (328). Enfin, il accélère la coagulabilité sanguine (324) (329) et il désensibilise l'organisme vis à vis du choc anaphylactique.

CHAPITRE VIII

La vitamine C en thérapeutique Pharmacologie

Besoins en vitamine C

De nombreux auteurs ont cherché à établir quelles étaient les doses d'acide ascorbique nécessaires à l'organisme.

Pour prévenir les troubles scorbutiques chez le cobaye, il faudrait :

2 mgr par kilogramme, selon Mme Randoin (330) ;
4,5 mgr. par kilogramme, selon Bezssonoff (27) ;
5 mgr. par kilogramme selon Dann et Cowgill (331) ;
7 mgr. par kilogr., selon Kramer, Harmann et Brill (276).

D'après Giroud et Leblond (332) ces doses seraient encore insuffisantes pour réaliser le taux normal. Toutefois, Zilva (333) et de Caro (298) estiment que cette réalisation n'est pas indispensable.

Pour l'homme, les besoins semblent être nettement inférieurs. Cependant, les conclusions à cet égard sont loin d'être uniformes. Gothlin (334) en se basant sur le test de résistance des vaisseaux prétend que 19 à 27 mgr. *pro die* doivent suffire. Riétschel (335) estime que 15 à 25 mgr. constituent une ration satisfaisante. Pour cet auteur, en effet, la vitamine C ne serait pas complètement détruite dans l'organisme, mais réduite après oxydation à un état intermédiaire d'où l'organisme pourrait la reconstituer par un mécanisme inverse synthétique. Toutefois, cette hypothèse qui expliquerait comment l'organisme peut se contenter de quantités très minimes de vitamine C, n'a pas encore été démontrée.

D'après JAVILLIER [336], la grandeur des besoins en vitamine est fonction de l'âge, du sexe, du régime alimentaire et de l'état de santé.

Les valeurs moyennes indispensables au sujet sain sont *pro die :*

Chez le nourrisson au moment du sevrage : 30 mgr. ;
Chez l'enfant : 30 à 50 mgr. ;
Chez l'adulte : 75 à 100 mgr.

Comme le font très justement remarquer MEUNIER et RAOUL [201], la divergence de ces résultats peut s'expliquer par le fait que certains auteurs considèrent comme suffisantes les doses préservant du scorbut (10 à 15 mgr). En fait, de telles doses, si elles empêchent les manifestations scorbutiques sont loin de permettre la réalisation du taux normal et elles risquent de provoquer des phénomènes d'hypovitaminose. D'ailleurs, les indications fournies par les méthodes chimiques (dosages, épreuves de charge, etc...), confirment cette opinion et il faut considérer les doses mentionnées par JAVILLIER comme celles qui correspondent le mieux aux besoins de l'organisme humain.

Avitaminose

La suppression totale de l'apport vitaminique détermine un état de carence qui constitue le scorbut.

Cette maladie se manifeste par des signes cliniques très nets : anorexie, asthénie, lésions dentaires et péridentaires (gingivite hémorragique, déchaussement des dents), lésions osseuses, lésions périarticulaires (hémorragies ostéo-périostées) et lésions vasculaires (purpura, hémorragies). Chez l'adulte, ce sont les lésions dentaires qui apparaissent en premier lieu. Dans le scorbut infantile (maladie de MOLLER-BARLOW), on observe une prédominance des lésions périarticulaires.

Expérimentalement, le scorbut aigu détermine la mort du cobaye en 25 à 30 jours sans provoquer de lésions osseuses ou articulaires importantes. Au contraire, le scorbut chronique cause chez cet animal d'énormes lésions osseuses et périarticulaires.

Chez l'homme, par suite des progrès de l'hygiène alimen-

taire, le scorbut typique est devenu très rare. Chez le nourrisson par contre, on le retrouve encore quelquefois. Il s'agit ordinairement d'enfants nourris artificiellement avec des laits ou des farines stérilisés.

Hypovitaminose

L'insuffisance de l'apport vitaminique détermine un état de précarence. Cette hypovitaminose est beaucoup plus fréquente qu'on ne le supposait autrefois. Il convient cependant, comme l'a fait remarquer Mouriquand, de distinguer dans l'hypovitaminose les formes frustes et les formes inapparentes.

Au stade fruste, la dystrophie est caractérisée par des signes imprécis : anémie, asthénie, anorexie, troubles digestifs, retard de la marche chez l'enfant, etc..., et le diagnostic s'avère souvent très difficile.

Au stade inapparent, le déséquilibre nutritif existe sans qu'il soit révélé par un signe quelconque : c'est une véritable phase asymptômatique. Mais il suffit qu'un facteur de réaction (variable suivant les cas), intervienne pour qu'apparaissent et se développent des lésions caractéristiques. Ainsi, des symptômes scorbutiques peuvent se manifester à la suite d'une maladie infectieuse, d'une parturition, d'une intoxication, etc...

Ces diverses notions sur les états de carence et de précarence ont été particulièrement étudiées par Lecoq (337), (338) ; Lesné (339) et surtout par Mouriquand (340), (400).

Paravitaminose

Signalons, enfin, que Mouriquand (341) a montré par l'expérimentation sur le cobaye que l'avitaminose C chronique présentait deux stades. Au cours du premier, on voit apparaître vers le 35e jour les signes typiques du scorbut qui sont facilement guéris par l'introduction dans la ration alimentaire d'une quantité suffisante d'acide ascorbique. Mais si l'on ne traite pas l'animal, vers le 70e jour, les signes typiques du scorbut disparaissent spontanément pour faire place, dans la plupart des cas, à une rétraction musculaire soudant le train postérieur et à des lésions d'ostéose et de périostéose

décelables à la radiographie. Or, ces lésions échappent à l'action spécifique de la vitamine C. Il s'agit donc de lésions aspécifiques et irréversibles. C'est ce que MOURIQUAND appelle la paravitaminose.

Causes de l'Avitaminose et de l'Hypovitaminose

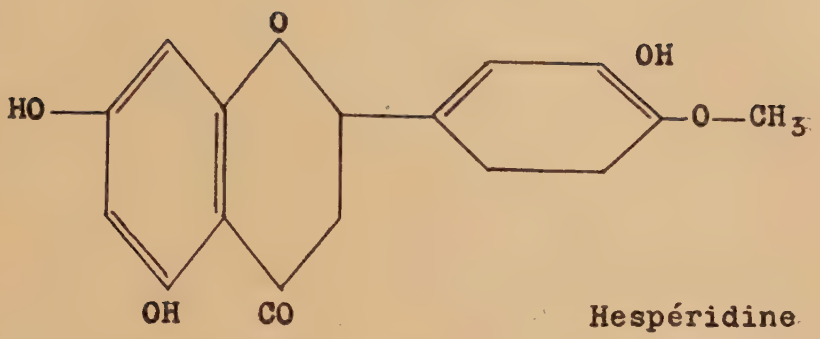
La cause principale de l'insuffisance en acide ascorbique résulte d'un apport nul ou trop faible en vitamine, c'est-à-dire d'un régime pauvre en aliment frais. Mais, à coté de cette carence exogène, il faut signaler des carences endogènes qui proviennent de l'organisme lui-même et qui correspondent à une absorption ou à une destruction anormale du facteur antiscorbutique. Ainsi, les troubles du tube digestif (ulcères gastriques et duodénaux, colites, entérites, etc...), peuvent être la cause d'une insuffisance vitaminique. SCHROEDER (344) a d'ailleurs montré que certaines races de colibacilles pouvaient détruire l'acide ascorbique, ce qui explique l'existence d'avitaminoses, malgré un apport alimentaire suffisant. De même, les maladies infectieuses (pneumonie, diphtérie, rhumatisme, etc...), ainsi que les intoxications (benzol), sont susceptibles de provoquer une carence en acide ascorbique.

Il ne faut pas oublier enfin que les besoins en vitamine C augmentent avec l'âge. En effet, UZAN (594) a montré que certains tissus de vieillards apparamment sains, contiennent dix fois moins d'acide ascorbique que les mêmes tissus chez l'enfant.

Complexité de la carence : Vitamine P

Les observations de BENTSATH, BÈRES et SZENT-GYORGYI ont permis de constater que certaines hémorragies qui semblaient scorbutiques, mais sur lesquelles l'acide ascorbique n'exerçait aucune action curative, étaient guéries par une substance qu'ils nommèrent vitamine P.

Les corps doués de l'activité vitaminique P appartiennent au groupe des flavonols. La « citrine », produit actif isolé du citron, par SZENT-GYORGYI, serait un mélange de deux flavonols ou plus exactement de leurs glucosides : l'hespéridine et l'ériodictyol. On pense que l'ériodictyol aurait une structure analogue à celle de l'hespéridine, mais qu'il ne contiendrait pas le groupement méthyle.



Hespéridine

Lotze (345) a montré que l'hespéridine, à elle seule, est inactive. La forte réactivité chimique des solutions de citrine et leur activité biologique seraient dûes surtout à l'ériodictyol, ce qui semble logique, puisque ce composé renferme un groupe orthodiphénol libre.

La préparation active de vitamine P contiendrait ces deux glucosides avec, en plus, de la quercitine. On peut l'obtenir à partir des écorces d'orange, de pamplemousse et surtout de citron. Cette vitamine serait susceptible de ralentir la chute de poids chez le cobaye soumis à un régime scorbutigène et de prolonger sa vie. Elle exercerait principalement une action anti-hémorragique. Jersild (346) a pu guérir un malade atteint d'hémorragies graves au moyen de la vitamine P, isolée du jus de citron, alors que l'acide ascorbique restait sans action. D'après Bentsath et Szent-Gyorgyi (347) et Bentsath et Das (348), la vitamine P ne développe son activité qu'en présence de petites quantités d'acide ascorbique.

Toutefois, l'étude expérimentale de l'avitaminose P semble difficile à réaliser car, d'une part, il n'existe pas de régime dépourvu de cette vitamine et, d'autre part, il n'y a pas d'espèce animale qui soit particulièrement sensible à cette carence.

Bien que ces faits ne soient pas définitivement établis, il semble qu'il y aurait lieu de dissocier les éléments dépendant de la carence P et ceux qui dépendent de la carence C proprement dite.

Importance des états de précarence

Comme l'a montré l'expérimentation, le rôle de l'insuffisance vitaminique est considérable en raison du développe-

ment possible de troubles fonctionnels divers (diminution de la résistance du terrain organique, diminution de la résistance aux toxines, etc.). Il y a donc pour le praticien un intérêt primordial à pouvoir déceler ces états de précarence.

Diagnostic des Etats de Précarence

En raison du manque de symptômes précis, le diagnostic clinique des états de précarence s'avère souvent très délicat. Pour pallier à cette difficulté, on pratique actuellement diverses épreuves qui permettent d'apprécier l'état vitaminique de l'organisme.

Nous n'exposerons que sommairement le principe de ces méthodes qui sont décrites en détail par Codvelle, Simonet et Mornard (349), Iancou, Oprisiu et Jula (406), Meunier et Raoul (201), Bigwood (351), (352) et Fabre (350).

Epreuve de Göthlin

La tendance à l'hémorragie constitue l'une des manifestations les plus caractéristiques du scorbut. Le corps entier peut être couvert de taches de purpura, mais les gencives et les articulations sont plus particulièrement atteintes. Ces phénomènes ne sont pas dûs à une augmentation du temps de saignement ou de coagulation, mais ils proviennent d'une hypotonicité des capillaires provoquée par la carence en vitamine C.

Pour déterminer la résistance des capillaires, Göthlin (353), (334) compte le nombre de pétéchies qui apparaissent sur une surface donnée du bras dans lequel la circulation veineuse est entravée par un brassard tensiométrique. La pression exercée est d'une durée de 15 minutes à 35 cm, puis 50 cm. de mercure, et on compte les pétéchies dans un cercle de 6 cm. de diamètre, tracé au niveau de l'avant-bras. S'il y a plus de 6 pétéchies après la pression de 50 cm. ou s'il en apparait après la pression de 35 cm, il y aurait hypovitaminose.

Par ce procédé, Göthlin et ses collaborateurs (354) ont décelé l'existence de lésions préscorbutiques chez 18 % des individus et ils ont montré que le nombre minima de pétéchies correspondait à une dose de 27 à 33 mgr. d'acide ascorbique par jour.

Epreuve de Dalldorf

D'autres auteurs, Dalldorf [355] et Adant [356], se basent sur le même principe, mais emploient un procédé différent : ils opèrent par succion au moyen d'une petite ventouse de verre reliée à un manomètre.

Mais la valeur de ces épreuves est très critiquée par Grenn [357] et par Baumann et Rappolt [358], car on n'a pas toujours retrouvé de corrélation entre la fragilité capillaire et la teneur du sang en vitamine C. D'après Schultzer [359] ces tests n'indiqueraient la carence que s'ils étaient modifiés par injection d'acide ascorbique. Enfin, comme le font remarquer Armentano [360], Dann et Glavind [361] il ne faut pas oublier que d'autres substances comme la vitamine P et peut-être même la vitamine E, influencent également la résistance mécanique des parois vasculaires.

Test de décoloration de Rotter

Cette méthode dûe à Rotter [362], Portnoy et Wilkinson [363], consiste à injecter sous la peau 1 cc de dichlorophénol-indophénol $N/_{400}$ et à mesurer le temps de décoloration. Si celui-ci est supérieur à dix minutes, il y a carence. Entre cinq et dix minutes, le sujet est normal. Enfin, s'il est inférieur à cinq minutes, il y a saturation des organes.

Codvelle, Simonet et Mornard [349] injectent sous la peau de l'avant-bras 1/60 de cc d'une solution à 80 mgr d'indophénol pour 100 cc ($N/_{333}$). Un temps de décoloration inférieur à dix minutes est normal.

Poucher et Stenbenrauch [364] contestent cette épreuve, car ils ne trouvent pas de relations entre la vitesse de décoloration et la teneur du sang en acide ascorbique.

La valeur de ce test semble douteuse, car il existe dans les tissus d'autres composés réducteurs (comme le glutathion) qui sont susceptibles de décolorer le dichlorophénol.

Dosage des liquides biologiques

Le dosage de l'acide ascorbique dans l'urine, le sang et le liquide céphalo-rachidien donne des indications précieuses sur l'état vitaminique de l'organisme. Les résultats, toute-

fois, différent sensiblement suivant la méthode de dosage employée. Aussi est-il bon d'utiliser toujours un procédé sensible et précis comme celui de la colorimétrie cinétique (cf. chapitre V).

D'après Harris et Ray (365), le taux d'acide ascorbique dans l'urine ne doit pas être inférieur à 10 mgr par jour.

Selon Eddy et ses collaborateurs (368), si le taux du plasma en acide ascorbique est voisin de 1 mgr. pour 100 cc, état très satisfaisant, entre 0,5 mgr. et 1 mgr., le régime alimentaire est acceptable, au-dessous de 0,5 mgr. pour 100 cc, il y a précarence.

Test de surcharge

L'acide ascorbique est retenu par l'organisme jusqu'à un seuil déterminé. En cela, il ne se comporte pas du tout comme un médicament, les sulfamides par exemple, dont l'élimination est indépendante des doses précédemment ingérées. Au contraire, la fixation ou l'élimination de l'acide ascorbique par l'organisme est intimement liée au passé alimentaire récent du sujet. C'est pourquoi, *s'il n'y a pas de carence, l'administration d'une dose massive de vitamine C doit provoquer une élimination urinaire importante d'acide ascorbique*. Tel est le principe sur lequel repose le test de Harris et Ray (365), (366), (367) qui semble être le meilleur procédé pour rechercher les carences occultes en acide ascorbique.

Type classique de surcharge. — On réalise l'état de saturation de l'organisme en administrant *per os* des doses moyennes répétées d'acide ascorbique (en général 300 mgr. par jour). On admet qu'il y a saturation quand l'élimination atteint 80 pour 100 de la dose ingérée. La différence entre la quantité donnée et la quantité éliminée correspond au déficit vitaminique. D'après Demole, on peut considérer comme normal un déficit de 600 à 900 mgr. Au-dessus de 1 gr. il est anormal. Au-dessus de 2 gr. il y a précarence, Dans des cas de scorbut on a trouvé un déficit atteignant 5 gr.

Type simplifié de surcharge. — La méthode précédente étant parfois assez longue (plusieurs jours), on se contente souvent d'un test simplifié. Vers 10 heures du matin on donne au sujet une dose massive et unique d'acide ascorbique (10 mgr. par kgr. de poids *per os* ou 300 mgr. par voie intraveineuse). On recueille les urines pendant les vingt-quatre heures qui suivent et on dose la vitamine C. Si la

quantité d'acide ascorbique éliminé est très inférieure au tiers de la quantité ingérée, il y a présomption de carence. En ce cas, il est recommandé de faire l'épreuve classique de surcharge.

Pour doser la vitamine C dans l'urine on peut utiliser la méthode de TILLMANS en procédant de la façon suivante :

a) On dissout dans 100 cc. d'eau distillée deux comprimés titrés de dichlorophénol indophénol (HOFFMANN - LA ROCHE), et on verse cette solution dans une burette graduée.

b) On met dans un bécher 20 cc. d'urine et on acidifie avec 2 cc. d'acide acétique glacial. Suivant la commodité, on étend avec de l'eau distillée.

c) On verse l'indicateur jusqu'à obtention d'une teinte rose persistant 30 secondes.

Soit n cc. utilisés. Comme 1 cc. d'indicateur correspond à 0,02 mgr. d'acide ascorbique, on aura $n \times 0{,}02 \times 5 =$ mgr. d'acide ascorbique pour 100 cc.

L'approximation des résultats ainsi obtenus est généralement suffisante pour la clinique. Bien entendu, si l'on désire des précisions, il faut avoir recours à une méthode plus exacte, comme celle de MEUNIER ou de MENTZER.

Nous signalerons enfin une autre technique particulièrement simple du test de surcharge. Le soir au coucher, on donne au sujet 300 mgr. d'acide ascorbique *per os*, et on recueille ses urines le lendemain matin au réveil : 20 cc. de cette urine doivent décolorer à froid, la solution dans 50 cc. d'eau d'un comprimé spécialement dosé de dichlorophénol indophénol (HOFFMANN - LA ROCHE). Si la décoloration ne se produit pas presque immédiatement, le sujet est carencé en vitamine C.

Remarque. — Pour assurer la conservation et la stabilité de l'acide ascorbique dans l'urine recueillie pendant 24 heures, CODVELLE, SIMONET et MORNARD [349] l'acidifient par de l'acide chlorhydrique. Avec 30 cc. d'acide chlorhydrique pur par 1.000 cc. d'urine, la conservation de l'acide ascorbique est parfaite.

La vitamine C en thérapeutique

Les diverses propriétés physiologiques de l'acide ascorbique d'une part, et l'étude systématique des phénomènes de

carence d'autre part, nous ont déjà permis de prévoir l'utilisation de la vitamine C en thérapeutique. En fait le domaine de la C vitaminothérapie s'est révélé si vaste que la littérature médicale de ces dernières années a été submergée d'observations à ce sujet. Sans vouloir nier la valeur thérapeutique incontestable de l'acide ascorbique, nous pensons toutefois qu'il faut se garder de certaines exagérations.

Nous nous bornerons ici à exposer d'une façon succinte les diverses affections justiciables directement ou indirectement de la C vitaminothérapie (603).

Scorbut — Maladie de Barlow — Etats préscorbutiques

Les cas de scorbut adulte ou infantile (maladie de Möller-Barlow) sont rares de nos jours en raison des progrès de l'hygiène alimentaire. La vitamine C administrée à la dose de 100 à 250 mgr, par jour amène la disparition de la maladie. De nombreux cas de guérison sont rapportés par Neuman (369), Brugsch (370), Schultzer (371), Banke (372), Mouriquand (407), Tanaka (424), etc...

Rappelons cependant que la thérapeutique par l'acide ascorbique est capable de guérir l'avitaminose C, mais non la dystrophie cellulaire généralisée qui accompagne le scorbut dans sa période terminale.

Les états préscorbutiques justiciables de la C vitaminothérapie sont, par contre, très nombreux. A ce stade précarentiel, on ne retrouve pas toujours les hémorragies ostéopériostées et gingivales, mais un cortège de petits signes cliniques très variés : arrêt du poids, anorexie, humeur chagrine, fatigue printanière, paresse scolaire, algies épiphysaires, œdèmes, eczéma, folliculites, poussées fébriles, diarrhée, gastro-entérite, etc... Véritablement protéiforme, cette avitaminose fruste est très difficile à dépister si l'on n'a pas recours au test de surcharge. Les doses préconisées dans ces états varient de 50 mgr. à 100 mgr. par jour.

Hémorragies — Etats hémorragipares

On ne peut encore expliquer d'une façon parfaite le mode d'action de l'acide ascorbique dans les syndromes hémorragiques. La vitamine C ne modifie pas le temps de coagula-

tion chez l'organisme normal, mais par contre, elle est susceptible de l'abaisser fortement dans les cas pathologiques. Elle joue en quelque sorte le rôle d'un régulateur du temps de coagulation. Toutefois son action la plus nette s'exerce sur la résistance et l'élasticité des parois des capillaires sanguins. En effet, chez le sujet non carencé, les capillaires sont riches en vitamine C qui semble assurer l'imperméabilité de leurs parois et, en conséquence, empêcher l'extravasion du sang. De plus; l'acide ascorbique augmente le rapport sérine/globuline et provoque une excitation de la thrombocytogénèse. D'autre part, si l'on tient compte des facteurs toxiques qui interviennent souvent dans la genèse des purpuras, la vitamine C pourrait agir également pas ses propriétés antitoxiques. Enfin, il ne faut pas oublier que l'action anti-hémorragique est renforcée par la présence de la vitamine P.

Böger et Schroeder (373), Glanzmann (379), Faure-Beaulieu (380) et Schuchard (381), ont employé avec succès l'acide ascorbique dans différents cas de purpuras.

Engelkes (374), Stepp (376), Kohl (382), Heeres (383), Dreyfus (384), Carneiro et d'Oliveira (385), Simici et Papadopol (417), l'ont utilisé dans l'hémophilie.

Vogt (377), Junghaus (375) et Siegert (386) le préconisent comme agent hémostatique dans les hémorragies utérines.

Il est également indiqué par Hasselbach (378) dans les hématémèses liées à des ulcères gastro-duodénaux, par Engelkes (387), Koranyi et Bentsath (388) dans les hématuries, par Baer (389), Leitner (390), Daniello et Iepure (391) dans les hémorragies des voies respiratoires (épistaxis et hémoptysies), par Viallefont, Villard et Diacono (392), (398) dans les hémorragies occulaires, et enfin par Dascalu et Dosios (416) dans les hémorragies post-opératoires.

Actuellement, l'acide ascorbique est utilisé contre les états hémorragiques les plus divers : hémophilie, thrombopénie, métrorragies, meloenas, hématémèses, purpuras divers, hématuries, hémorragies post-opératoires, etc...

Dans les maladies hémorragiques, l'acide ascorbique administré par la voie buccale n'a aucune efficacité. Ce fait pourrait être la conséquence d'un trouble de l'assimilation ou d'une destruction anormale de la vitamine dans l'intestin. On a constaté d'ailleurs qu'en cas d'achlorhydrie ou de gastro-entérite, l'absorption de l'acide ascorbique est très

compromise. Pour être efficace, le traitement doit se faire par voie intraveineuse. Les doses utilisées sont comprises entre 100 et 500 mgr. par jour. Généralement des doses de 200 mgr. sont suffisantes.

Affections globulaires — Anémies

Mme Randoin et Michaud [393] ont montré que la carence en vitamine C produisait des modifications profondes du sang : augmentation de sa teneur en eau, en chlore, en urée, diminution de sa teneur en potassium, en fer, et enfin un important abaissement de la résistance globulaire. L'avitaminose C provoque un trouble profond du métabolisme du fer dont la teneur dans le foie baisse beaucoup plus encore que dans le sang.

Böger et Martin [394] ont montré que l'acide ascorbique n'est pas doué de propriétés nettement hématopoïétiques et qu'il ne participe pas à la formation de l'hémoglobine. Cependant, la présence de la vitamine C dans le sang est indispensable, car elle est pour ce milieu biologique un oxydo-réducteur puissant qui favorise les phénomènes respiratoires. Bien que ne contribuant pas directement à la formation des hématies, l'acide ascorbique stimule les oxydo-réductions dont les globules rouges sont le siège.

Quoi qu'il en soit, les nombreuses observations cliniques de Friend et Hadler [395], Sacrez [396], Galinowski, Landsberg et Gorecki [397], Mettier et Chew [399] etc., montrent l'utilité de la C vitaminothérapie dans les diverses formes d'anémies : anémies d'origine alimentaire ou post-infectieuse, leucémies, chlorose, troubles de la formule sanguine, etc.

Aussi dans la plupart des cas, est-il utile d'adjoindre aux sels de fer et aux extraits hépatiques l'acide ascorbique qui exalte leurs propriétés hématopoïètiques.

Cardiopathies

L'acide ascorbique augmente la diurèse, ralentit les battements du cœur et abaisse la tension artérielle.

Par comparaison avec les autres diurétiques, la vitamine C se place après le chlorure d'ammonium, la théobromine et avant la digitale. On peut donc la ranger dans la classe des

tonicardiaques mineurs et on pourra l'utiliser avec fruit comme cure d'entretien entre deux séries de médicaments plus actifs comme l'ouabaïne ou la digitale.

Lueg et Hamman (426), Evans (427), Delamare (428) préconisent l'emploi de la vitamine C dans les cardiopathies.

Dystrophies osseuses et dentaires

En l'absence de vitamine C, les ostéoblastes perdent leur faculté d'élaborer le tissu osseux et reprennent le type embryonnaire de fibroblastes. Aussi, chez les sujets carencés, les zônes d'accroissement de l'os se transforment en zônes fibreuses. On sait d'ailleurs que les fractures spontanées sont fréquentes au cours du scorbut et on peut constater à l'autopsie des lésions d'ostéoporose.

Hancke (401) et de nombreux auteurs préconisent l'emploi de l'acide ascorbique pour stimuler la formation du cal des fractures et pour éviter des pseudo-arthroses.

Le système bucco-dentaire est particulièrement sensible à l'avitaminose C. Ruppe (402), Rinné (403), Vauthier (404) et Howe (405) ont montré que les dents sont attaquées très précocement et les lésions deviennent assez rapidement irréversibles. La pulpe dentaire est atteinte la première, puis les odontoblastes sont touchés à leur tour ainsi que leurs prolongements, les fibres de Tomes. Fisch et Harris (408) estiment que l'acide ascorbique joue un rôle prépondérant dans l'odontogènése.

Chez l'homme soumis à un régime déficient, les lésions dentaires se manifestent rapidement et au bout d'une dizaine de jours les altérations sont déjà sensibles. L'hypovitaminose C ne provoque pas seulement des troubles prédisposant la dent à la carie, mais elle frappe également les gencives, les alvéoles et les maxillaires.

Etant donné que la consommation de vitamine C durant la période de gestation se trouve augmentée, Peyrus (409), Strohl (410), Schneider (411), Kramer (412), Tourbiers et Buschan (413) insistent tout particulièrement sur la nécessité de donner de l'acide ascorbique chez les femmes enceintes pour éviter les caries dentaires et les gingivites gravidiques.

Fasoli et Hoffer (414) ont obtenu de bons résultats en administrant de l'acide ascorbique dans la gingivite hémorragique aigüe.

Enfin, d'après Hermann (605), Stanley et Glazerbrook (415) et de nombreux auteurs, la C vitaminothérapie est également recommandée chaque fois qu'il y a lieu d'améliorer le trophisme des tissus péridentaires, dans les cas de stomatites, gingivites, pyorrhées, abcès dentaires, fistules, etc.

Troubles de l'appareil digestif

a) *L'hypovitaminose C diminue la résistance du tractus digestif.* — Normalement, les parois du tractus digestif renferment d'importantes réserves d'acide ascorbique. L'intestin carencé sera donc prédisposé aux ulcérations, aux hémorragies et il sera plus sensible aux infections. Sous l'effet de la carence, les sécrétions sont ralenties et la désintégration des albumines s'effectue plus difficilement.

Schnetz (508), Menschikow (418), Hetenyi (419), Galvan (420), Thiele (421), Debray (423), Toullec et Riou (422), Chopra et Ray (425) ont montré qu'un grand nombre d'affections comme l'anorexie, la constipation, la diarrhée, la maladie coeliaque et la sprue peuvent être dûes à une carence en acide ascorbique. Il en est de même des entérocolites graves, des gastro-entérites infantiles, des tuberculoses intestinales, des ulcères, des gastrites et des hépatites de forme cirrhosique. Tous ces troubles sont très améliorés par des injections intraveineuses de vitamine C. Il ne faut pas oublier, en outre, que par son pouvoir anti-hémorragique, l'acide ascorbique exerce une heureuse influence sur les hématémèses et les méloenas.

b) *Les maladies du tube digestif entravent l'assimilation de l'acide ascorbique.* — Un bon fonctionnement de l'appareil digestif est indispensable pour assurer le métabolisme normal de la vitamine C. En effet, on observe fréquemment des avitaminoses chez des malades atteint d'une affection du système digestif malgré un régime équilibré. Chez de tels sujets par conséquent, les doses d'acide ascorbique doivent être fortement augmentées. Il est d'ailleurs préférable d'avoir recours directement à la voie parentérale tant que les conditions d'assimilation ne sont pas améliorées.

Maladies infectieuses

Dans toutes les maladies infectieuses, l'organisme se révèle très déficient en vitamine C. Thaddea et Hoffmeister (429) ont constaté que la teneur en acide ascorbique du liquide

céphalo-rachidien qui est en moyenne de 1,59 mgr. chez l'homme sain, tombe à 0,40 mgr. au plus fort de la maladie infectieuse. Ce taux remonte peu à peu, au fur et à mesure que l'infection devient moins virulente et que le malade approche de sa convalescence. Il est à noter d'ailleurs, que tous les auteurs ayant étudié cette question ont toujours trouvé un parallélisme entre la gravité de l'affection et le déficit en acide ascorbique.

Le rôle protecteur de la vitamine C est important surtout en ce qui concerne les toxi-infections retentissant sur la glande surrénale (diphtérie, tuberculose).

D'autre part, Büller-Souto et Lima (430), (431) ont étudié expérimentalement l'action de l'acide ascorbique sur différentes toxines (b. perfringens, b. oedematiens, b. histolyticus, vibrion septique, etc.). Ils ont montré que la vitamine C n'agit pas seulement *in vivo* en augmentant la résistance organique contre la toxine, mais encore *in vitro* en exerçant une action neutralisante plus ou moins accusée.

Enfin, Mercier (432) a constaté que le pouvoir hémolytique de la toxine staphylococcique est diminué *in vitro* par l'acide ascorbique, mais qu'il reparait si on dialyse cet acide. Mercier envisage la formation d'un complexe inactif toxine-acide ascorbique. Toutefois, cette hypothèse ne peut être retenue car, administrée au lapin, la vitamine C ne diminue pas la virulence de la toxine staphylococcique.

En résumé, il ne semble pas que l'acide ascorbique exerce une action décisive sur l'agent pathogène lui-même. Mais par contre, il semble que l'administration de la vitamine C doive jouer un rôle essentiel dans le traitement de la carence provoquée par l'infection. Ainsi, par son action indirecte, l'acide ascorbique augmenterait la résistance de l'organisme vis-à-vis des toxines.

Diphtérie. — Bien que Jungeblut (433) et Zilva (434) aient prétendu que l'état scorbutique n'augmentait pas la sensibilité du cobaye à la toxine diphtérique, de nombreux auteurs ont démontré le contraire. Polonyi (435), Jeney et Gagyi (440), Philippe et Harde (436), (437) ont réussi à protéger, par des injections répétées d'acide ascorbique, des cobayes qui avaient reçu des doses mortelles de toxine.

Enfin Mouriquand, Sedaillan et Cœur (438), (439) ont montré que dans l'intoxication diphtérique, les caspsules surrénales

perdent leur acide ascorbique. Aussi dans les diphtéries graves, est-il recommandé d'adjoindre à la sérothérapie spécifique, la vitamine C à haute dose (200 à 500 mgr. par jour) ainsi que l'hormone cortico-surrénale.

Tuberculose. — Les observations de Policard (441) Weber (450) Tonutti et Wallraff (442), Jetter et Bumbalo (443) (444) démontrent que la plupart des tuberculeux sont en état d'hypovitaminose C. Baüer et Vorwek (445) estiment le déficit en vitamine C du tuberculeux à 2.500 mgr. en moyenne.

Vaquette (446), Albrecht (447), Hasselbach (378) (449), Daniello et Iepure (391) ont montré que dans la tuberculose pulmonaire, la C vitaminothérapie, à doses suffisantes et prolongées, relevait l'appétit, augmentait les forces, consolidait la résistance à l'infection et provoquait la reprise du poids ainsi que la chute de la température.

En outre, par son action sur la résistance des parois capillaires, l'acide ascorbique exerce une heureuse influence sur les hémoptysies de faible importance. De même, dans la tuberculose intestinale il évitera l'apparition des ulcérations et des hémorragies.

Mario Ballan (448) et Alexander (451) estiment que la C vitaminothérapie (par voie intraveineuse) a peu d'effet dans les hémoptysies graves ou moyennes, mais que par contre, elle donne d'excellents résultats dans les hémoptysies légères.

Enfin, par son action désensibilisante, l'acide ascorbique facilite le traitement de la tuberculose par les sels d'or et la tuberculine, en évitant les accidents assez fréquents (érythème, stomatite, etc.), provoqués par cette thérapeutique.

Dans le traitement de la tuberculose, Warns (452) donne tout d'abord 250 mgr. par jour, puis il abaisse progressivement la dose jusqu'à 50 mgr. Hasselbach (378), (449) conseille de donner pendant 7 jours 300 mgr. d'acide ascorbique par jour pour assurer la saturation, puis de continuer le traitement avec 100 à 150 mgr. par jour.

Dans la tuberculose du larynx, Griebel (459) préconise le traitement par la vitamine C associée à la vitamine B_1. Cette dernière, en raison de son action sur les lésions muqueuses, est à conseiller comme médication adjuvante.

Dans les tuberculoses exsudatives graves, l'administration d'acide ascorbique reste sans effet.

Pneumonie. — Tonutti et Matzner (453) ont examiné les exsudats de la pneumonie au moyen de colorants électifs de la vitamine C intracellulaire (nitrate d'argent, chlorure d'or). Ils ont constaté qu'il y avait une très forte élimination vitaminique au niveau de ces exsudats. On peut en conclure que l'organisme mobilise une quantité importante de vitamine C pour combattre cette affection, ce qui explique le déficit en acide ascorbique observé chez les pneumoniques, déficit qui va jusqu'à 3.500 mgr.

Gander et Niederberger (454) ont montré qu'il existe un parallélisme évident entre la courbe saisonnière de mortalité par pneumonie et la courbe des variations de l'hypovitaminose C avec l'époque de l'année, qui atteint son maximum, comme la mortalité pneumonique, en Mars-Avril.

Harris, Abbasy, Yudkin et Kelly (455), Mikulowski (456), Jezler et Kapp (457) ont également reconnu que la pneumonie était l'une des maladies qui consommait le plus de vitamine C.

Tous ces auteurs, de même que Hochwald (458), Bohnholtzer (460), Kondo (464), Gunzel et Krœhnert (463), ont constaté l'influence bienfaisante de la C vitaminothérapie dans la pneumonie. L'administration journalière de 500 mgr. d'acide ascorbique jusqu'à la défervescence, puis de 100 à 200 mgr. jusqu'à la guérison complète, permet d'obtenir une chute rapide de la température, un pouls satisfaisant, des modifications favorables de la formule sanguine et un état général meilleur. Toutefois, les observations cliniques montrent d'une part, que les résultats sont d'autant plus favorables que la C vitaminothérapie est appliquée plus tôt, le premier ou le deuxième jour et, d'autre part, qu'il y a intérêt à poursuivre le traitement pendant la convalescence pour renforcer la résistance organique diminuée par la maladie.

A titre prophylactique, l'acide ascorbique est donnée avec succès par Vogl (461) chez les opérés, et par Schnetz (462) chez les grippés, pour éviter l'apparition de pneumonie.

Enfin, grâce à son rôle désensibilisant, la vitamine C facilite le traitement de la pneumonie par les sulfamides.

Grippe. — Schnetz (462) estime que l'injection hypodermique journalière de 300 à 500 mgr. d'acide ascorbique permet d'éviter les complications si fréquentes de la grippe.

Herpès, zona. — Daïnow (465) a obtenu des résultats remar-

quables en traitant l'herpès et le zona par des injections intraveineuse de vitamine C à raison de 100 mgr. par jour.

Coqueluche. — Le développement du bacille de Bordet-Gengou en culture sur milieu solide est arrêté par l'apport de 2,5 mg. d'acide ascorbique par cc. du milieu. L'action de la toxine injectée chez l'animal est nettement diminuée par la présence de vitamine C.

Tanaka (424), Otani (466), Plate (467) et Gairdner (472) ont guéri de nombreux cas de coqueluche par une série d'injections de 100 mg. d'acide ascorbique. Ormerod et Unkauf (469) préconisent la posologie suivante : le premier jour 350 mgr ; puis le deuxième jour 250 mgr. et successivement 200, 200. 150, 150, 125, 125 mgr. chacun des jours suivants, pour se stabiliser à 100 mgr. jusqu'à la guérison.

Pour le nourrisson, on peut donner 500 mgr. à la mère allaitant son enfant, le premier jour, puis on décroit comme précédemment jusqu'à 150 mgr. par jour.

Fièvres éruptives. — Falke (474) a constaté que la rougeole, la scarlatine, ainsi que toutes les fièvres éruptives provoquaient un déficit notable en acide ascorbique. Comme l'a montré Robert (468), l'administration systématique de 200 mgr. de vitamine C par jour évite les complications fréquentes de ces maladies en renforçant la résistance de l'organisme.

Fièvre typhoïde, typhus. — Comme le font remarquer Munteanu-Bacau (471) et Kudlac et Storch (470), l'influence de la vitamine C est particulièrement intéressante dans le traitement de ces affections. En effet, par son action tonifiante sur le système vasculaire, l'acide ascorbique exercera une heureuse influence sur les tendances hémorragiques qui se manifestent dans la typhoïde et le typhus.

Rhumatismes. — Mouriquand et ses collaborateurs (479) (480), en réalisant un scorbut expérimental chronique à évolution progressive, par carence partielle en vitamine C, ont provoqué des réactions d'ostéose et de périostéose déterminant des manifestations du type rhumatisme chronique.

D'autre part, Françon (481), Kuhnau (482), Abbasy et Harris (473), Hall, Darling et Taylor (475), Rinehart et ses collaborateurs (476) (477) (478) ont constaté que chez les rhumatisants le taux plasmatique d'acide ascorbique est réduit

notablement et que l'épreuve de charge révèle des besoins élevés en vitamine C.

La carence en acide ascorbique prédispose sans doute à la localisation microbienne dans différents types d'arthrites infectieuses. Les besoins en vitamine C sont particulièrement élevés dans l'arthrite rhumatismale, l'arthrite gonococcique, le rhumatisme chronique et le rhumatisme articulaire aigu. L'expérimentation clinique a d'ailleurs démontré l'utilité de la C vitaminothérapie dans les différentes formes de rhumatismes. Rinehart est partisan de donner, dans les cas aigus, 200 à 400 mgr. d'acide ascorbique intraveineux par jour puis, la crise passée, une dose d'entretien par voie buccale jusqu'à la guérison.

Infections diverses. — Il faut signaler enfin que la C vitaminothérapie a permis d'obtenir d'excellents résultats dans diverses infections : septicémies, poliomyélites, ostéomyélites, malaria, etc...

Vitamine C et Glandes

Medullo surrénale. — La teneur relativement élevée de la médullo surrénale en acide ascorbique ne paraît présenter aucun rapport avec ce que l'on sait aujourd'hui de sa physiologie. Kasahara (310) a constaté que l'administration simultanée d'acide ascorbique et d'adrénaline (pour le cobaye 20 mgr. d'acide ascorbique et 1 γ d'adrénaline) provoquait une forte hypertension tandis que, injectés séparément et aux mêmes doses, ces substances ne produisent aucune action. De leur côté, Giroud et Santa (483) ont montré que la sécrétion d'adrénaline provoquée par excitation de la médullo surrénale n'entraînait aucune variation du taux de l'acide ascorbique dans cette glande.

Cortex surrénal. — Maladie d'Addison. — Grâce à un procédé précis de dosage de l'hormone cortico surrénale, Giroud et ses collaborateurs (484) ont pu montrer que celle-ci disparaissait progressivement au cours de la carence en vitamine C et qu'elle réapparaissait dès l'administration d'acide ascorbique. Il semble donc établi que ce dernier joue un rôle important dans la formation de la cortine.

L'utilisation de la C vitaminothérapie dans la maladie d'Addison a donné lieu à des résultats très contradictoires.

Laederich, Worms, Payet et Mentzer [485] ont pu guérir un addisonien par l'administration *per os* d'acide ascorbique à des doses très élevées. De Gennes et Mahoudeau [486] estiment que la vitamine C peut renforcer l'action de la cortine, mais qu'elle ne saurait la remplacer.

Enfin, d'après certains auteurs, l'acide ascorbique n'améliore pas l'état général des addisoniens.

Par contre, les nombreuses observations cliniques rapportées par Charif Emani [487] établissent que la pigmentation cutanée de cette maladie peut être, sinon guérie, du moins très nettement atténuée par la vitamine C.

La divergence de ces opinions a été remarquablement analysée par Mahoudeau [488]. Nous pensons avec lui que la question comporte deux aspects selon qu'on se trouve en présence d'un malade atteint d'hypovitaminose C ou d'un insuffisant cortico-surrénal.

Pancréas. — Leitao [489], Barthelheimer [490] et Borsetti [491] ont noté que l'acide ascorbique exerçait une action hypoglycémiante faible, susceptible de renforcer l'effet de l'insuline. En outre, la vitamine C donne des résultats appréciables dans le traitement de la mélanodermie du diabète bronzé.

Ovaire. — Vlcek [492], Glick et Biskind [223], [273], Giroud et ses collaborateurs [274] ont montré qu'il y avait dans l'ovaire un véritable cycle de la vitamine C superposable au cycle sexuel. Tout se passe comme si la sécrétion de la progestérone par le corps jaune exigeait une forte concentration cellulaire en acide ascorbique. De ce fait l'hypovitaminose C semble être responsable de certaines insuffisances ovariennes et de troubles de la menstruation ou de la gestation. Mouriquand et Schoen [275] ont d'ailleurs constaté la fréquence des avortements à la 4e semaine de la gestation chez les cobayes en état d'avitaminose C. L'emploi de l'acide ascorbique dans certains cas de stérilité ou d'avortement habituel semble donner des résultats intéressants.

Thyroïde. — Giedosz [493], Lewis [499], Thaddea et Runne [307], Fischer et Oehme [495], Fischbach et Terbruggen [496] ont montré que la vitamine C exerçait une action antagoniste sur la sécrétion thyroïdienne. Chez le rat, l'administration de thyroxine élève le taux de créatine dans l'urine, mais cet effet est inhibé si l'on donne 40 mgr. par jour d'acide ascor-

bique. L'hyperthyroxinisation des cobayes appauvrit leurs organes en facteur antiscorbutique. Les pertes en glycogène hépatique provoquées par l'administration de thyroxine chez le cobaye sont arrêtées par l'addition de vitamine C dans le régime.

Il est à noter d'ailleurs que la vitamine A et la vitamine B_1 exercent à l'égard de la thyroxine une action antagoniste analogue.

L'hyperthyroïdie semble donc être justiciable de la C vitaminothérapie. Lohr (497) et Sendrail (498) ont traité avec succès la maladie de Basedow en associant l'acide ascorbique (150 mgr. par jour) à la diiodotyrosine. En raison de l'action très nette de la vitamine A sur l'hyperthyroïdie, il y aurait lieu, semble-t-il, d'associer également cette vitamine au traitement de la maladie de Basedow.

Psychiatrie

Bersot (500), Thorpe (501), Altmann et Goldhamer (502) ont constaté que les sujets atteints de troubles mentaux étaient toujours en état d'hypovitaminose C. Demole (503), Lucksch (504), Kramer (505), Rondepierre (507), Merland et Ollivier (506) préconisent les injections intramusculaires d'acide ascorbique (100 mgr. par jour) dans le traitement de certaines affections mentales : dépression nerveuse, mélancolie, neurasthénie, démence précose, psychose basedowienne, confusion mentale, encéphalite psychosique azotémique etc.

Cancer

Gordonoff et Zudwig (509) ont étudié l'action des vitamines sur des tumeurs, non pas chez l'animal, mais *in vitro* en utilisant la culture des tissus : fibroblastes et tissus carcinomateux. Ils ont fait varier la teneur du liquide nourricier en vitamines et ont mesuré le développement tissulaire. Pour ces auteurs, l'acide ascorbique n'aurait aucune action particulière sur le cancer.

Fodor et Kunos (510), en traitant par de la vitamine C des souris cancéreuses, ont constaté que le développement de la tumeur est nettement favorisé par l'acide ascorbique, surtout s'il est administré *per os*.

Arloing, Morel et Josserand [511] travaillant sur des lapins porteurs de cancers greffés du testicule ont montré que la vitamine C accélérait non seulement le développement de la tumeur mais plus encore celui des métastases. Les complexes cupro-ascorbiques se montrent tout aussi favorisants. Par contre, l'addition du fer inhibe totalement l'action cancérigène de l'acide ascorbique, et les auteurs emploient des injections intraveineuses de ferro-scorbone dans le traitement des cancers gastriques.

Dans le même ordre d'idée, Berard et ses collaborateurs [512] signalent que des injections intraveineuses d'acide déhydroascorbique procurent une amélioration de l'état général et une désinfiltration de la masse tumorale. On pourrait ainsi rendre opérable certaines tumeurs malignes, permettre la reprise de l'alimentation dans les cas de tumeur de la langue et soulager les algies des néoplasmes douloureux.

Ces diverses expériences montrent que si le complexe ferro-scorbone et l'acide déhydroascorbique peuvent améliorer certains états cancéreux, il faut, par contre, utiliser avec précaution la C vitaminothérapie chez certains sujets prédisposés, notamment chez le vieillard, en raison de la possibilité du réveil brutal d'un cancer latent.

Ophtalmologie

Les recherches expérimentales ont montré que la teneur en acide ascorbique de l'humeur aqueuse et du cristallin était particulièrement élevée. D'autre part, on a constaté que le taux en acide ascorbique du cristallin diminue avec l'âge, s'abaisse avec l'opacification pour disparaître dans la cataracte mûre qu'elle qu'en soit la cause (âge, maladie, traumatisme). En même temps que le cristallin s'appauvrit en vitamine C, l'humeur aqueuse voit son taux diminuer et se stabiliser aux environs de celui du sang.

Franta [513], Muller [514], Pavia [515], Dubois-Poulsen [516], Silva et Novaes [517], Weistein [518] et de nombreux auteurs se sont intéressés à ce problème qui a donné lieu à de vives controverses, les uns voyant dans l'avitaminose C la cause de la cataracte, les autres considérant au contraire cette avitaminose comme une conséquence.

En fait, d'une part, l'avitaminose expérimentale n'a pu provoquer que très rarement des opacités cristalliniennes et

d'autre part, les tentatives de prévention de la cataracte par la C vitaminothérapie ont abouti à des échecs. D'après Pluvinage (519) il semble donc qu'il faille considérer la chute du taux en acide ascorbique comme le reflet des lésions du cristallin et non comme leur cause.

Par contre, en raison de son action hémostatique, la vitamine C a été utilisée avec succès dans certaines affections oculaires Bezssonoff (520), Ravina (521), Velhagen (522), Duke-Elder (524), Diacono (398), Viallefont et ses collaborateurs (392) (523) ont obtenu d'excellents résultats dans l'héméralopie, la rétinite pigmentaire et surtout dans les hémorragies rétiniennes spontanées ainsi que les hémorragies récidivantes du corps vitré. L'acide ascorbique doit être administré à la dose de 80 à 100 mgr. en utilisant de préférence la voie parentérale si une action rapide est nécessaire.

Signalons, enfin, que Mme Randoin et Mlle Mazoué (525), (526) ont mis en évidence l'action favorable exercée par l'acide ascorbique sur la formation des fibres conjonctives.

Dermatologie

La C vitaminothérapie semble être particulièrement indiquée dans certaines affections cutanées.

Mélanodermies. — Versari (494), Drigalski (527), Tencho (528), Schade (529), Cornbleet (530), Hoff (531), Kahler et Lacroix (532) ont montré le rôle important de l'acide ascorbique dans les pigmentations pathologiques de la peau.

Charif Emani (487), Duvoir-Pollet et ses collaborateurs (533), Schroeder et Einhauser (534), Layani et ses collaborateurs (535) ont constaté que les mélanodermies, quelle qu'en soit l'origine (cirrhose, insuffisance rénale, diabète, syphilis, chloasma, etc.), peuvent être, sinon guéries, du moins sensiblement atténuées par l'acide ascorbique à hautes doses (250 mgr. par jour).

Psoriasis. — Lutz (536), Reiss (537), Rostenberg (538) et Welcker (539) ont employé avec succès la vitamine C (300 mgr. par jour en injection intraveineuse), dans le traitement de l'érythème, des lésions du type kératosique et surtout du psoriasis.

Brûlures. — On conçoit très bien que les brûlures graves, en raison des phénomènes toxi-infectieux qu'elles provo-

quent, puissent être améliorées au moyen de la vitamine C. Par des expériences sur des cobayes, ainsi que par des observations cliniques, EINHAUSER (540) a montré que l'association de l'acide ascorbique à l'hormone cortico-surrénale (sans exclure les mesures chirurgicales et dermatologiques habituelles) pouvait amener la guérison des brûlures graves. Dans ce cas, la vitamine C doit être administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire et à très hautes doses : 2.000 mgr. par jour la première semaine, 1.000 mgr. la semaine suivante et 500 mgr. la troisième semaine.

Phénomènes d'intolérance. — En raison de son pouvoir désensibilisant l'acide ascorbique inhibe les diverses réactions cutanées qui peuvent se produire par suite de l'administration de certains médicaments (sérum, arsenic, sulfamides, etc.),

Manifestations Allergiques

Anti-anaphylaxie. — Désensibilisation. — Immunité. — La C vitaminothérapie diminue la fréquence des accidents produits par le choc anaphylactique.

HASIMOTO (541), HOCHWALD (542), PACHECO et PARA (543), UNGAR et ses collaborateurs (544) ont mis en évidence le pouvoir protecteur de l'acide ascorbique vis-à-vis des phénomènes d'anaphylaxie. Toutefois, YOSHIKAWA (545) et SCHAFER (546) ont montré qu'il ne s'agissait pas là d'une action vitaminique proprement dite puisque les cobayes privés de vitamine C n'ont pas une sensibilité accrue au choc.

UNGAR et ses collaborateurs (544) expliquent l'action antichoc de la vitamine C par le fait que l'acide ascorbique inhibe la mise en liberté de l'histamine ou d'une substance voisine au moyen d'un processus de désamination. VAUTHEY (547) pense que l'équilibre en vitamine C est nécessaire au bon fonctionnement du système réticulo-endothélial hépatique, et c'est un trouble secondaire de celui-ci qui expliquerait les accidents. Enfin, DAÏNOW (548) rattache la sensibilité du système autonome à l'hypovitaminose C ; ainsi s'expliqueraient les accidents que l'on peut constater chez les sujets carencés. Il est difficile jusqu'à plus ample informé, de choisir entre ces hypothèses encore relativement fragiles.

D'autre part, les expériences de MIYAO (549), P. et A. GIROUD (550), LIMA (551), WEITZENBERG (552), TAKAHASI (553),

Schiarwtzer (554) et Diacono (555) établissent d'une manière incontestable que l'acide ascorbique introduit dans l'organisme exerce une action certaine sur les phénomènes d'immunité.

Jusatz (556), Madison et Manwaring (557) ont montré que l'administration de vitamine C chez le lapin activait la formation des anticorps anti-cheval.

Wulner (558), Tonutti et Matzner (453), Messina et Verga (559) ont également constaté que la lyse des cellules mortes de pneumocoques varie suivant la teneur des organes en acide ascorbique.

Ecker et ses collaborateurs (560), (561) ont établi que la teneur du sang en *complément* diminue durant l'avitaminose C chez le cobaye et redevient normale lorsqu'on donne de la vitamine C ou des plantes vertes à l'animal. De plus, ces auteurs ont pu réaliser, *in vitro*, l'activation du *complément* sanguin au moyen de l'acide ascorbique. Cette propriété est vraisemblablement due au pouvoir oxydo-réducteur de la vitamine C.

Enfin, Cotrufo (562) a montré que le traitement par l'acide ascorbique au cours d'une vaccination spécifique provoque une augmentation considérable des réactions immunitaires. Le pouvoir agglutinant, de même que le pouvoir de fixation du complément et le pouvoir phagocytaire sont plus que doublés du fait de la C vitaminothérapie.

Ainsi l'administration systématique d'acide ascorbique au cours de la sérothérapie ou de la vaccinothérapie présente le double avantage d'inhiber le choc anaphylactique et de renforcer les phénomènes d'immunité.

Intolérance à la chimiothérapie. — Svirbely (563), Borsetti (564), Pfeiffer et Arnove (565), Holmes (566), Lauber (567), Castrovilli (604), Daïnow et Zimmet (568) ont constaté que la plupart des empoisonnements (selenium, tellure, plomb, arsenic, bismuth, narcotiques, alcool, benzol, etc.), provoquaient une baisse importante de la teneur en vitamine C de l'organisme. Ils ont également remarqué qu'une injection d'acide ascorbique augmentait la résistance à l'intoxication.

De telles propriétés ont attiré l'attention sur l'utilité de la C vitaminothérapie dans le traitement préventif ou curatif des phénomènes d'intolérance provoqués par certains médicaments chimiques.

Daïnow (548), Piésocki (569), Landsfisch (570), Montesano (571),

Bise [572], Falconner [573], Friend [574] et de nombreux auteurs ont établi que l'intolérance aux arsénicaux était due en grande partie à une déficience de l'organisme en vitamine C.

Durel [575], Vauthey [547], Cormia [576], Leibowitz et Guggenhein [577] ont montré que des animaux carencés supportaient moins bien l'arsenic que des animaux normaux, et que des cobayes hypervitaminés en facteur C ne peuvent être sensibilisés à ce toxique.

In vitro, l'addition d'une faible quantité d'acide ascorbique retarde l'oxydation d'une solution d'arsénobenzène laissée à l'air. D'après Daïnow, la vitamine C se comporterait d'une façon analogue *in vivo* en inhibant l'oxydation des arsenicaux pentavalents dans les tissus, ce qui diminue leur toxicité. Dans un organisme carencé, la combinaison du médicament avec la vitamine ne se fait pas ou se fait d'une manière incomplète. L'arsénobenzène rapidement oxydé dans les tissus devient toxique et déclenche l'apparition de phénomènes d'intolérance. Il semble toutefois que l'acide ascorbique n'agisse pas seulement en raison de son grand pouvoir réducteur. Il est probable qu'il intervient surtout par ses propriétés désensibilisantes.

Alors que, selon Durel, l'administration chez la souris du mélange vitamine C-arsénobenzène dans une même seringue semble abaisser fortement l'activité thérapeutique du médicament, il n'en est pas de même en clinique humaine. En effet, Daïnow a obtenu d'excellent résultats en additionnant chaque injection d'arsénobenzène de 50 mgr. d'acide ascorbique. Cette divergence d'opinion peut s'expliquer par la différence des quantités de vitamine utilisées, car les doses d'acide ascorbique ajoutées à l'arsénobenzène par Daïnow sont dix fois moins fortes que celles administrées par Durel, chez la souris.

Benech [581] préconise également l'emploi d'une solution d'acide ascorbique comme solvant des novarsénobenzènes.

Etant donné la parenté qui existe entre les accidents des diverses chimiothérapies, de nombreux auteurs ont associé la vitamine C aux différents agents chimiques susceptibles de provoquer des phénomènes d'intolérance.

Les accidents consécutifs au traitement bismuthique ou mercurique sont supprimés ou du moins notablement atténués par l'acide ascorbique. Sande [578] recommande l'asso-

ciation de la vitamine C aux sels d'or, dans le traitement des tuberculeux, des asthmatiques et des rhumatisants.

Gennerich (579) et Daïnow (548) considèrent l'acide ascorbique comme le médicament spécifique des accidents dûs aux sulfamides. Dumazert et Grebus (580) préconisent l'association dans un même comprimé de sulfamide-cystéine et vitamine C.

Ainsi, l'ensemble des observations cliniques montre que la C vitaminothérapie empêche l'apparition des phénomènes d'intolérance (stomatite, érythème, érythrodermie, manifestations cutanées diverses, etc.), consécutifs à la chimiothérapie arsenicale, bismuthique, aurique ou sulfamidée.

Manifestations allergiques diverses. — L'acide ascorbique est susceptible d'atténuer ou même de guérir certaines manifestations allergiques.

Rosenberg (582) et Hochwald (542), (583) l'ont employé avec succès dans le traitement de l'urticaire, de l'eczéma et du rhume des foins.

Epstein (584), Michelet (586), Hagiesco et ses collaborateurs (585) ont étudié le traitement de l'asthme par la vitamine C. Ils ont constaté que l'administration intraveineuse de 250 mgr. d'acide ascorbique déterminait la cessation de l'accès. Les crises suivantes ont tendance à s'atténuer et à s'espacer. Il convient toutefois de maintenir chez les malades un traitement d'entretien préventif : tous les mois cinq injections de 100 mgr. d'acide ascorbique.

Epstein (584) obtient des résultats remarquables en associant chez les asthmatiques l'acide ascorbique aux sels d'or.

Grossesse — Allaitement — Nourrissons

Comme l'a montré de Rezende (587), la teneur en acide ascorbique des tissus de la femme enceinte ou récemment accouchée diminue fortement (jusqu'à 70 %), soit qu'il s'agisse d'une carence pathologique, soit qu'on ait à faire à une simple modification de l'équilibre physiologique due à la gravidité ou à l'état puerpéral. Cette diminution est plus marquée à la fin de la gestation qu'au début.

Torok et Neufeld (588), Doxiades (589), Luiz-Dalheim et Guimaraes (590) considèrent les vomissements de la grossesse comme une manifestation de l'hypovitaminose C, car ces

phénomènes disparaissent sous l'action de l'acide ascorbique.

D'autre part, les caries si fréquentes au cours de la gestation et de l'allaitement sont surtout dues au fait que l'organisme maternel est épuisé en vitamine C par les mises en réserve du foetus ou les besoins du nourrisson. Il est donc particulièrement recommandé, pour assurer la protection de la mère et de l'enfant, d'administrer l'acide ascorbique à doses suffisantes durant ces périodes.

Enfin, Babonneix (591), Wachholder (592), Levine et ses collaborateurs (593) font remarquer qu'en dépit de la richesse du lait de femme en acide ascorbique, les nourrissons peuvent ne pas recevoir intégralement leur provision de vitamine C. Ces besoins sont encore accrus chez le nourrisson soumis à l'allaitement artificiel.. De plus, il ne faut pas oublier que les laits sont généralement moins riches en acide ascorbique à la fin de l'hiver et au printemps. Aussi, les auteurs insistent sur la nécessité d'instituer à titre préventif la C vitaminothérapie chez le nourrisson, surtout à l'époque printanière.

Fatigue — Convalescence — Vieillesse

Ratsimamanga (598) a montré que l'acide ascorbique n'intervient pas seulement dans le muscle localement, mais encore qu'il assure un équilibre d'éléments importants pour l'activité musculaire comme le glycogène, l'acide lactique et l'acide créatine-phosphorique. La vitamine C intervient à la fois au niveau du muscle et au niveau de la cortico-surrénale.

Le travail augmente les besoins en acide ascorbique, et il n'est pas rare de constater de l'hypovitaminose chez les individus fournissant un gros effort physique.

De même, l'administration de vitamine C est à conseiller chez les convalescents, qui présentent presque toujours un déficit notable en acide ascorbique.

Enfin, d'après Fabre (350) et Uzan (594), la fréquence de l'hypovitaminose C chez le vieillard serait la cause de certaines maladies chroniques. L'acide ascorbique est donc indiqué chez les sujets âgés, mais il convient toutefois de l'administrer avec prudence, car il est susceptible de favo-

riser le développement des néoplasmes latents qui existent assez souvent à cet âge.

Indications diverses

On a signalé encore d'autres applications de la C vitaminothérapie.

Armentano et Bentsath [595] préconisent l'acide ascorbique intraveineux dans l'hémoglobinurie paroxystique.

Proto [596] estime que la vitamine C peut jouer un rôle favorable dans la cicatrisation des plaies.

Enfin Bastien [597] recommande l'emploi de l'acide ascorbique en chirurgie, pour améliorer le terrain, préparer l'acte opératoire, éviter le choc et favoriser la convalescence.

Formes médicamenteuses

La vitamine C est livrée dans le commerce sous forme de comprimés pour la voie buccale et de solutions injectables pour la voie parentérale. Ces produits, rigoureusement titrés, correspondent à des quantités déterminées d'acide l ascorbique. Comme le montre le tableau I, les laboratoires spécialisés ont adopté des dosages qui rendent très facile l'emploi thérapeutique de la vitamine C.

TABLEAU I

Nom du produit	Acide l ascorbique en mgr.			
	Par comprimé	Par ampoule de 1 cc.	Par ampoule de 2 cc.	Par ampoule de 5 cc
Vitascorbol (Specia).....	50	50	100	500
Laroscorbine (Hoffmann-La Roche)	50	»	100	500
Vitamine C (Byla).....	50	100	»	500
Cebion (Merck).....	50	50	100	500
Cantane (Bayer).....	25	25	100	»

Posologie et modes d'administration

a) *A titre prophylactique.* — La dose journalière d'acide ascorbique nécessaire pour maintenir l'état de saturation varie entre 50 et 100 mgr. chez l'adulte. Pour l'enfant, elle n'est que de 25 à 30 mgr., et chez le nourrisson on estime les besoins à 1 mgr. par kgr. de poids.

En général, il est bon d'instituer un traitement préventif dès qu'interviennent certains facteurs physiologiques ou pathologiques : gestation, allaitement, nourrissons, convalescents, malades mis au régime, tels que rénaux, hépatiques, ulcéreux, intestinaux, etc. Dans ces divers cas, il faut administrer de 50 à 100 mgr. d'acide ascorbique par jour. Souvent, il est nécessaire de vérifier l'état de saturation de l'organisme pour déterminer avec plus de précision la dose optima. En outre, il ne faut pas oublier que l'hypoacidité ou l'anacidité du suc gastrique, de même que la présence de certaines flores bactériennes intestinales peuvent détruire la majeure partie de la vitamine C absorbée *per os*. Chez ces malades, il faut avoir recours au traitement mixte, par voie bucale et parentérale.

Dans les affections fébriles (grippes, tuberculose, pneumonie, etc.), il faut employer de très fortes doses (500 mgr. et plus) par voie parentérale.

Enfin, toute chimiothérapie peut être utilement précédée par une injection de 500 mgr. d'acide ascorbique.

b) *A titre thérapeutique.* — Dans certains cas particuliers : scorbut, états hémorragipares, purpuras, maladies infectieuses, etc., il est nécessaire d'administrer l'acide ascorbique par voie intraveineuse. Une fois l'amélioration obtenue, on peut poursuivre le traitement par voie buccale.

En même temps que l'acide ascorbique, il est recommandé de faire absorber des jus de citron ou d'orange qui contiennent une certaine quantité de vitamine P, qui complète et renforce l'action de la vitamine C.

Dans les manifestations de précarence, on recommande l'administration journalière de 300 mgr. *per os* durant une dizaine de jours. Dans la plupart des cas, ce traitement suffit à obtenir l'état de saturation.

D'après les observations cliniques de nombreux auteurs, on peut résumer dans le tableau II la posologie moyenne des principales affections justiciables de la C vitaminothérapie.

TABLEAU II

Indications cliniques	Posologie journalière	Voie d'introduction
Scorbut. Etats préscorbutiques	300 mgr. 500 mgr.	hypodermique et intravein. *per os*
Maladie de Barlow.....	50 mgr. 100 mgr.	intramusculaire *per os*
Etats hémorragiques. Anémies	200 à 300 mgr.	intraveineuse
Système osseux et dentaire.	50 à 150 mgr.	*per os*
Maladies du tube digestif...	100 à 400 mgr.	intraveineuse
Maladies infectieuses, intoxications	Doses variables suivant le degre de l'infection 200 à 1.000 mgr Pour les détails, voir l'exposé précédent	intraveineuse et *per os*
Affections oculaires.....	50 à 300 mgr.	*per os* et parentérale
Pigmentations cutanées.....	100 à 250 mgr.	*per os* et parentérale
Désensibilisation, anaphylaxie	100 à 200 mgr.	*per os* et parentérale
Gestation, allaitement.....	100 à 300 mgr.	*per os*
Régimes insuffisants.....	100 mgr.	*per os*

Tolérance

L'acide ascorbique n'est pas toxique. Toutefois, Widenbauer (599) a observé des phénomènes d'intolérance après administration de 650 mgr. chez le nourrisson et 1.000 mgr. chez l'adulte. Les nausées, la céphalée, l'érythème rubéoliforme ou scarlatiniforme, l'urticaire, l'œdème, la diarrhée et le ralentissement du pouls sont les manifestations des propriétés vagotoniques de la vitamine C. Ces symptômes, qui sont d'ailleurs sans gravité, surviennent exclusivement chez des sujets particulièrement sensibles. Aux doses thérapeutiques habituelles, de telles réactions n'ont jamais été signalées.

Pour éviter l'hypervitaminose, il suffit de ne pas dépasser 500 mgr. chez l'enfant et 1.000 mgr. chez l'adulte.

Comme tout produit nouveau, la vitamine C a été employée un peu partout dans des directions très diverses, et son application dépasse largement le cadre du scorbut.

Le fait que la C vitaminothérapie puisse s'appliquer à des affections aussi variées, exclut toute idée d'une action spécifique. Il semble plus logique d'admettre que toute maladie provoque un état d'hypovitaminose plus ou moins accusé. Par suite, l'administration de vitamine C supplée à cette carence passagère et provoque une modification favorable du terrain qui permet au sujet de lutter plus efficacement contre l'affection. Dès lors, l'acide ascorbique apparaît principalement comme une médication adjuvante aspécifique, destinée à préparer et à renforcer l'action de thérapeutique très diverses.

D'autre part, les travaux modernes mettent en évidence les corrélations d'action des vitamines entre elles et avec les principaux organes, spécialement les glandes endocrines. Il n'est donc pas indifférent d'introduire dans l'organisme, sans raison sérieuse, des substances aussi actives, dont beaucoup d'effets nous sont encore inconnus.

C'est pourquoi, loin de nier le rôle considérable que prend la C vitaminothérapie, nous estimons cependant qu'il ne faut pas tomber dans l'excès qui suit toujours les « débuts » d'une nouvelle thérapeutique et faire de celle-ci une panacée universelle.

CONCLUSIONS

« *Ce n'est pas assez de compter les*
« *expériences, il les faut peser et assor-*
« *tir ; il les faut avoir digérées et alam-*
« *biquées pour en tirer les raisons et*
« *les conclusions qu'elles portent.* »

(MONTAIGNE).

Les remarquables travaux des chimistes, des physiciens, des biochimistes, des physiologistes et des médecins ont permis d'élucider la plupart des questions qui se posaient aux chercheurs lorsque SZENT-GYORGYI isola pour la première fois la vitamine C.

La formule de structure proposée actuellement répond à toutes les propriétés physiques et chimiques de l'acide ascorbique.

Les méthodes de dosage spécifiques et précises nous ont renseigné sur la répartition de la vitamine C dans le règne animal et végétal.

La synthèse, enfin, de l'acide ascorbique a facilité une expérimentation clinique qui a mis en lumière les ressources insoupçonnées de la C vitaminothérapie.

Faudrait-il en conclure que, dans l'état actuel de nos connaissances, il n'y a plus de « *problème de la vitamine C* » ? Nous ne le croyons pas.

On a pu établir à quelle structure chimique il convenait de rapporter l'action vitaminique. On a, d'autre part, mis en évidence le rôle important que jouait dans l'organisme l'acide ascorbique comme facteur d'oxydo-réduction. Ces diverses constatations ont sans doute permis d'expliquer l'intervention de la vitamine C dans certains phénomènes

d'ordre physiologique et biochimique, mais, par contre, lorsque nous nous demandons comment elle agit pour empêcher l'apparition du scorbut, nous devons avouer notre ignorance.

La découverte de la vitamine P dont l'action anti-hémorragique est manifeste dans les phénomènes scorbutiques vient encore ajouter à la complexité de la question.

D'ailleurs, et de plus en plus, la vitamine C semble particulière à bien des égards. C'est ainsi qu'à l'encontre des autres vitamines elle n'est pas nécessaire à tous les animaux ; seul un petit groupe d'entre eux ne peut s'en dispenser. D'autre part, elle agit à doses relativement importantes, de l'ordre du milligramme par kilogramme de poids, alors que les quantités suffisantes des autres vitamines sont de l'ordre du millième de milligramme seulement.

L'étroite corrélation qui semble exister entre la vitamine C d'une part, et la vitamine P d'autre part, permettra-t-elle de résoudre ce problème ? C'est sans doute ce qu'un avenir prochain nous apprendra.

BIBLIOGRAPHIE

1. Venette (N.). — Traité du Scorbut où l'on peut connoistre fort exactement la plupart des maladies qui arrivent sur la mer, leurs causes, leurs signes et les remèdes dont on se doit servir pour les combattre. Simon Bernard, éd., Paris-La Rochelle, 1671.

2. Bachstrom (J.-F.). — Observationes circa Scorbutum, ejusque indolem, causas, signa et curam, *Lugduni Batavorum*, Leyde, 1734.

3. Hardem (A.) et Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1918, 12, p. 259.
Zilva (S.). — *Ibid.*, 1923, 17, p. 416.
— — 1924, 18, p. 186.
— — 1925, 19, p. 589.

4. Bezssonoff (N.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1921, 173, p. 466.

5. Bezssonoff (N.). — *Bull. Soc. Sc. Hyg. Alim.*, 1923, 11, pages 14 et 38.

6. Connell (S.-J.-B.) et Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1924, 18, p. 641.

7. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1928, 22, p. 779.

8. Tillmans (J.). — *Zeit. f. Untersuch. der Lebensmitt*, 1930, 60, p. 34.
Tillmans (J.) et Hirsch (P.). — *Ibid.* 1932, 63, p. 1 ; 1933, 65, p. 145.

9. Szent-Gyorgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1928, 22, p. 1387.

10. Rygh et Laland. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1932, 204, p. 114.

11. Bezssonoff (N.). — *Revue de Chim. Industr.*, 1932, 42, p. 90.

12. Waugh (W.-A.) et King (C.-G.). — *J. Biol. Chem.*, 1932, 97, p. 325.

13. Svirbely (J.-L.) et Szent-Gyorgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1932, 26, p. 865.

14. Birch (T.-W.), Harris (L.-J.) et Ray (S.-N.). — *Nature*, 1933, 131, p. 273.

15. Svirbely (J.-L.) et Szent-Gyorgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 279.

16. Hirst (E.-L.) et Zilva (S.).— *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 1271.

17. Karrer (P.) et Coll. — *Helvetica Chim. Acta*, 1933, 16, pages 181 et 302.

18. Micheel (F.) et Kraft (K.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 215, p. 215.

19. Cox (E.-G.), Hirst (E.-L.), Reynolds (R.-W.). — *Nature*, 1932, 130, p. 888.

20. Herbert (R.-W.), Hirst (E.-L.), Percival (E.-G.-W.), Reynolds (R.-W.) et Smith (F.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1933, p. 1270.

21. Cox (E.-G.). — *Nature*, 1932, 130, p. 205, et *J. Biol. Chem.*, 1936, p. 769.
Cox (E.-G.) et Hirst (E.-L.). — *Nature*, 1933, 131, p. 402.

22. Hirst (E.-L.). — *Chemistry and Industry*, 1933, 52, p. 221.

23. Hirst (E.-L.), Percival (E.-G.-W.) et Smith (F.). — *Nature*, 1933, 131, p. 617.

24. Micheel (F.) et Kraft (K.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 218, p. 280.

25. Criegee, — *Lieb. Ann.*, 1932, 495, p. 211.

26. Karrer (P.), Scharwzenbach (G.) et Schopp (K.). — *Helvetica Chim. Acta*, 1933, 16, p. 302.

27. Bezssonoff (N.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1934, 16, p. 1107.

28. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1924, 18, p. 632.

29. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1925, 19, p. 589.

30. Szent-Gyorgyi (A.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1933, 15, p. 694.

31. Svirbely (J.-L.) et Szent-Gyorgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 279.

32. Banga (I.) et Szent-Gyorgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1934, 28, p. 1625.

33. Reichstein (T.), Grussner (A.) et Oppenauer (R.). — *Helvetica Chim. Acta*, 1933, 16, pp. 561 et 1019, et *ibid.* 1934, 17, p. 510, et *Nature*, 1933, 132, p. 280.

34. Haworth (W.-N.) et Hirst (E.-L.). — *J. Chem. Industr. Soc.*, 1933, 52, p. 645. — *Helvetica Chim. Acta*, 1934, 17, p. 520.

35. Ault (R.-G.), Baird (D.-K.), Carrington (H.-C.), Haworth (W.-N.), Herbert (R.-W.), Hirst (E.-L.), Percival (E.-G.-C.), Smith (F.) et Stacey (M.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1933, p. 1419.

Baird (D.-K.), Haworth (W.-N.), Herbert (R.-W.), Hirst (E.-L.), Smith (F.) et Stacey (M.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1934, p. 62.

36. Reichstein (T). — *Brev. suisse 169.855* des 10-4-33 et 1-9-34. *Brev. français 770.816* des 27-3-34 et 21-9-34. *Brev. anglais 425.198* du 10-4-33.

37. Schlubach (H.) et Vorwerk (J.). — *Ber.*, 1933, 66, p. 1251.

38. Reichstein (T.) et Grussner (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, p. 311.

39. Reichstein (T.). — *Brev. suisses 174.028* du 1-4-35 et *175.347* des 25-10-33 et 1-5-35. *Brev. anglais 427.286* des 15-10-34 et 16-5-35 et *428.814* - *428.815* des 15-10-34 et 13-6-35.

40. Hoffmann-La Roche et Cie. — *Brev. hongrois 112.852* des 15-10-34 et 2-9-35. *Brev. suisse 174.080* des 15-3-34 et 16-4-35. *Brev. hollandais 36.674* des 13-3-34 et 15-10-35. *Brev. français 779.883* des 18-10-34 et 13-4-35, et *780.055* des 15-10-34 et 13-6-35. *Brev. danois 50.522* des 16-3-34 et 5-8-35. *Brev. anglais 435.971* du 10-1-35.

41. Micheel (F.) et Kraft (K.). — *Naturwiss.*, 1934, 22, p. 205.

42. Micheel (F.), Kraft (K.) et Lohmann (W.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 225, p. 13.

43. Haworth (W.-N.), Hirst (E.-L.), Jones (J.-K.-N.) et Smith (F.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1934, p. 1192. — *Brev. anglais 443.901* des 1-9-34 et 9-4-36.

44. Hoffmann-La Roche et Cie. — *Chem. Zentr.*, 1936, 2, p. 3194. — *Brev. suisse 183.450* des 22-5-35 et 16-6-36.

45. Elger (F.). — *Chem. Zentr.*, 1937, 1, p. 2992.

46. Hoffmann-La Roche et Cie et Wenner (W.-K.).— *Chem. Zentr.*, 1937, 1, p. 3675. — *Brev. suédois 88.094* des 19-5-36 et 15-12-36.

47. Helferich (B.) et Peters (O.). — *Ber.*, 1937, 70, p. 465. — *Chem. Zentr.*, 1937, 1, p. 3024. — *Brev. allemand 637.448* des 31-7-34 et 29-10-36. *Brev. américain 2.068.453* des 9-7-35 et 19-1-37.

48. Cox (E.-G.) et Goodwin (T.-H.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1936, p. 769.

49. Karrer (P.), Von Euler (H.) et Hellström (H.). — *Ark. Kemi. Mineral. Géol.*, 1933, n° 6.

50. Carpeni (G.). — *Thèse de Sciences Physiques*, Paris 1938.

51. Herbert (R.-W.), Hirst (E.-L.) et Wood (C.-E.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1933, p. 1564.

52. Randoin (L.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1935, 17, p. 67.

53. Hendricks (S.-B.). — *Nature*, 1934, 133, p. 178.

54. Karrer (P.). — *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, p. 58.

55. Laki (K.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 217, p. 54.

56 Wurmser (R.) et De Loureiro (J.). — *Jour. de Chim. physique*, 1934, 31, p. 419. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, p. 543.

57. Borsook (H.), Davenport (H.-W.), Jeffreys (C.-E.-P.) et Warner (R-C.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1937, 117, p. 237.

Borsook (H.), Ellis et Hoffman. — *Jour. Biol. Chem.*, 1937, 117, p. 281.

58. Martini (E.). — *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1933, 8, p. 1711.

59. Meunier (P.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, pp. 113 et 877.

60. Birch (T.-N.) et Harris (L.-J.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 595.

61. Micheel (F.) et Kraft (K.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 218, p. 280 et 1933, 222, p. 235.

62. Vargha (L.). — *Nature*, 1932, 130, p. 847

63. Erlbach (H.) et Ohle (H.). — *Berichte*, 1934, 67, p. 555.

64. Haworth (W.-N.), Hirst (E.-L.) et Jones (J.-K.-N.). — *Jour. Chem. Soc.*, 1937.

65. Micheel (F.) — *Annalen.*, 1935, 519, p. 70 et 1935, 525, p. 66.

66. Ohle (H.) et Böckmann (G.). — *Berichte*, 1934, 67, p. 1750.

67. Maurer (K.) et Schiedt (B.). — *Biochem. Ztschr.*, 1934, 271, p. 9 et 1936, 285, p. 67.

68. Mouriquand (G.), Arloing (F.), Morel (A.), Josserand (A.) et Armand (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, p. 661.

Arloing (F.), Morel (A.) et Josserand (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 118, pp. 551 et 1435.

69. Zilva (S.) et Kellie (A.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 590.

70. Fox (W.-F.) et Lévy (L.-F.).— *Biochem. Jour.*, 1936, 30, p. 208.

71. Linderstrom-Lang, Holter et Seborg-Ohlsen. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 227, p. 1.

72. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1936, 30, p. 1215.

73. Ball (E.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1937, 118, p. 219.

74. De Loureiro (J.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1936, 18, p. 757. Wurmser (R.) et De Loureiro (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 589.

75. Becker (E.) et Di Gleria (J.). — *Ztschr. f. Vitaminforsch.*, 1937, 6, p. 86.

76. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, pp. 941 et 944.

77. Chevallier (A.) et Choron (Y.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, p. 743. — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 510

78. Rohmer (P.), Bezssonoff (N.), Stoerr (E.) et Perrier (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 118, p. 1090.

79. Baumann. — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 1246.

80. Vlès (F.), Reiss (P.) et Deloyers (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 108, p. 37.

81. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 695.

82. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.), — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1938, 20, p. 93. — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 132, p. 538.

83. Karrer (P.) et Bendas (H.). — *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, p. 743.

84. Lévine (V.-E.). — *Proc. Soc. exp. biol. Med.*, 1936, 35, p. 231.

85. Emmerie (A.). — *Acta brevia Néerl. Physiol. Pharmacol.*, 1934, 4, p. 141.

86. Holz (P.). — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1936, 182, pp. 98 et 109

87. Jorissen (W.-P.) et Belinfante (A.-H.). — *Rec. trav. Chim. Pays-Bas*, 1936, 55, p. 374.

88. West (E.-S.) et Ney (L.-F.). — *Science*, 1936, 84, p. 294.

89. Britzinger (H.). — *Kolloid Ztschr.*, 1937, 78, p. 22.

90. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1936, 203, p. 275. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 893.

91. Kolodziejska (Z.), — D'après *Chem. Zentr.*, 1937, 1, p. 3821.

92. Carteni (A.) et Morelli (A.). — *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1936, 11, p. 158.

93. Barron (E.-S.-G.), De Meio (R.-H.) et Klemperer (F.). — *Jour. biol. Chem.*, 1936, 112, p. 625.

94. Mentzer (C.) et Vialard-Goudou (A.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 707.

95. Kon (S.-K.) et Watson (M.-B.). — *Biochem. Jour.*, 1930, 30, p. 2273.
Kon (S.-K.). — *Science*, 1937, 85, p. 119.

96. Reyher (P.). — *Klin. Woch.*, 1926, 5, p. 2341.

97. Hottinger (A.), — *Klin. Woch.*, 1927, 6, p. 1793.

98. La Mer (V.-K.), Campbell (H.-L.) et Sherman (H.-C.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1920, 18, p. 122.

99. Eddy (W.-H.), Shelow (E.), Pease (R.-A.), Richer (M.) et Walkings (L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1922, 19, p. 155.

100, Mouriquand (G.), Tête (H.), Wenger (G.) et Viennois (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1937, 204, p. 1904.

101. Richet (C.). — *C. R. Acad. Méd., in* Concours Médical, mars 1941, p. 602.

102. Hirst (E.-L.). — *Jour. Chem. Industr. Soc.*, 1933, 52, p. 221 ; *Nature*, 1932, 129, p. 576 et 1932, 130, p. 888.

103. Marthoud (R.). — Contribution à l'étude de l'emploi des dinitrobenzènes comme réactifs du groupement carbonyle, *Thèse de Parmacie*, Lyon, 1935.

104. Bezssonoff (N.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1934, 16, p. 1119.

105. Wachholder (K.) et Podesta (H.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1936, 239, p. 149.

106. Von Euler (H.) et Burström (D.). — *Biochem. Ztschr.*, 1935, 283, p. 153.

107. Tillmans (J.) et Hirsch (P.). — *Biochem. Ztschr.*, 1932, 250, p. 312.

108. Ettori (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1936, 202, p. 852.

109. Bachstez (M.) et Cavallini (G.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 228, p. 25.

110. Barac (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 61.

111. Tauber (H.). — *Mikrochem.*, 1935, 17, p. 111.

112. Paget (M.) et Berger (R.). — *C. R. Soc Biol.*, 1938, 129, n° 33.

113. Glick (D.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1935, 109, p. 433.

114. Glick (D.) et Biskind (G.-R.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1935, 110, pp. 1 et 583 et *ibid.* 1936, 115, p. 551.

115. Giroud (A.) et Leblond (C.-P.). — L'acide ascorbique dans les tissus et sa détection, *Actualités Scientifiques et Industrielles*, n° 435, Hermann et C^ie^, éd., Paris, 1936.

116. Moll (Th.) et Wieters (H.). — *Merck's Jahresberichte*, 1936, 50, p. 65.

117. Svirbely (J.-L.), Szent-Gyorgyi (A.), Haworth (W.-N.), Hirst (E.-L.) et Reynolds (J.-N.). — *Nature*, 1932, 129, p. 576.

118. Hinsberg (K.) et Ammon (R.). — *Biochem. Ztschr.*, 1936, 288, p. 102.

119. Ferrand (M.). — Etude critique de quelques méthodes chimiques de dosage de l'acide ascorbique, *Thèse de Pharmacie*, Lyon, 1936.

120. Wieters (H.). — *Merck's Jahresberichte*, 1936, 49, p. 77.

121. Reichstein (T.), Scharwz (L.) et Grussner (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1935, 18, p. 353.

122. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1935, 29, p. 1612.

123. Bamdas (E.-M.), Lavrov (B.-A.), Rodionov (V.-M.) et Jarussova (N.-S.). — *Problems of Nutrition*, Moscou, 1938, 7, n° 2, p. 6.

124. Muller (H.) et Reichstein (T.). — *Helv. Chim. Acta*, 1938, 21, p. 273.

125. Demole (V.). — *Helv. Chim. Acta*, 1938, 21, p. 277.

126. Rodionov (V.-M.). — *Bull. Acad. Sc. U. R. S. S.*, 1936, p. 923.

127. Gottardo Jr. (P.) et Miller (C.-O.). — *Ztschr. f. Vitaminforsch.*, 1938, 7, p. 118.

128. Micheel (F.) et Mittag (R.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1937, 257, p. 34.

129. Micheel (F.) et Mittag (R.). — *Naturwissenschaften*, 1937, 25, p. 158.

130. Dalmer (O.). — *Deutsch Med. Woch.*, 1934, 60, p. 1.200.

131. Ku (Y.-T.). — *Kitasato Arch. Exp. Méd.*, 1938, 15, p. 80.

132. Griasnov (N.-I.). — *Problems of Nutrition*, Moscou, 1937, 6, n° 3, p. 55.

133. Clutterbuck (P.-W.), Raistrick (H.) et Reuter (F.). — *Biochem. Jour*, 1935, 29, pp. 300, 871 et 1300.

134. Harris (L.-J.) et Ray (S.-N.). — *Biochem. Jour*, 1933, 27, pp. 303, 387, 580, 2006, 2011 et 2016.

135. Ranganathan (S.). — *Indian Jour., Med. Research.*, 1935, 23, p. 239.

136. Tauber (H.) et Kleiner (I.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1935, 108, p. 563 et *ibid* 1935, 110, p. 1559.

137. Ahmad (B.). — *Indian Jour. Med. Research*, 1935, 22, p. 789 ; *Biochem. Jour.*, 1935, 29, p. 275 ; *Nature* 1935, 136, p. 797.

138. Bessey (O.-A.) et King (C.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, 103, p. 687.

139. Birch (T.-H.-W.), Harris (L.-J.), Ray (S.-N.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 590.

140. Birch (T.-H.-W.), Harris (L.-J.), Ray (S.-N.) et Dann (W.-J.). — *Nature*, 1933, 131, p. 273.

141. Dzeh-Young-Liu et Yang (C.-S.). — *Chinese Jour. Physiol.*, 1936, 10, p. 355.

142. Daniel (E.-P.) et Munsell (H.-E.). — *Vitamins contents of foods*, 1 vol. ; *U. S. dept. of Agriculture Miscell*, Public. n° 275, Washington, juin 1937.

143. Bogart et Hughes. — *Jour., of Nutrit.*, 1935, 10. p. 157.

144. Hou (H.-C.). — *Chinese Journ. Physiol.*, 1935, 9, p. 253 et *ibid* 1936, 10, pp. 179, 221 et 291.

145. Bacharach (A.-L.), Cook (P.-M.) et Smith (E.-L.). — *Biochem. Jour*, 1934, 28, p. 1038.

146. Quinn, Burtiss et Milner. — *Journ. of biol. Chem.*, 1927, 72, p. 557.

147. von Hahn (F.-V.). — *Ztschr. Unter. Lebensm.*, 1931, 61, et *ibid* 1933, 66, p. 261.

148. Lunde (G.) et Mathiesen (E.). — 1er Congrès International de la Conserve, Paris, octobre 1935, p. 56, E. Desfossés, éd., Paris.

149. Banerjee (H.-N.). — *Sci. and Cult.*, 1935, 1, p. 159.

150. Lévy (L.-F.). — *Nature*, 1936, 138, p. 933.

151. Lévy (L.F.) et Fox (F.-W.). — *Biochem Jour.*, 1935, 29, p. 884.

152. Mac Henry (E.-W.) et Graham (M.-L.). — *Biochem. Jour.*, 1935, 29, p. 2013 ; *Nature*, 1935, 135, p. 871.

153. Guha (B.-C.) et Pal (J.-C.). — *Nature*, 1936, 137, p. 946 et *ibid* 1937, 139, p. 843.

154. Ghosh (B.) et Guha (B.-C.). — *Journ. Indian Chem. Soc.*, 1937, 14, p. 721.

155. Ghosh (A.-R.) et Guha (B.-C.). — *Nature*, 1934, 134, p. 739 et *ibid* 1935, 135, pp. 234 et 871.

156. Guha (B.-C.) et Sen-Gupta (P.-N.). — *Nature*, 1938, 141, p. 974.

157. Giroud (A.), Leblond (C.-P.) et Rabinowicz (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, p. 1088.

158 Giroud (A.), Leblond (C.-P.) et Ratsimamanga (A.-R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, p. 612 et *ibid* 1934, 118, p. 321 et 1935, 118, p. 1311 ; *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1935, 17, p. 232.

159. Giroud (A.), Leblond (C.-P.), Ratsimamanga (A.-R.) et Rabinowicz (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 633.

160. Giroud (A.), Leblond (C.-P.), Ratsimamanga (A.-R.), Rabinowicz (M.) et Drieux (H.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 1105.

161 Giroud (A.), Ratsimamanga (A.-R.), Leblond (C.-P.), Chaiofin et Rabinowicz (M.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1936, 18, p. 573.

162. Giroud (A.), Leblond (C.-P.) et Randoin (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 297 ; *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1935, 17, p. 1649.

163. Edelstein (E.), Langer (H.) et Langstein (L.). — *Deutsch Med. Woch.*, 1931, 57, p. 839.

164. Reiche (A.). — *Deutsch Med. Woch.*, 1932, 58, p. 929.

165. Olliver Mammie. — 1er Congrès international de la Conserve, Paris, octobre 1937, p. 51, E. Desfossés, éd., Paris.

166. Morgan et Field. — *Journ. of biol. Chem.*, 1929, p. 579.

167. Harden et Robinson. — *Biochem. Jour.*, 1921, 15, p. 521.

168. Gauducheau. — *Presse Médicale*, 1938, 1, p. 113.

169. Martel (H.). — *C. R. Acad. Méd.*, *in* Concours Médical, mars 1941, p. 642

170. Perrot (E.), Millat (L.) et Colas (R.). — *Bull. Acad. Méd. Paris*, 1937, 117, p. 468.

171. Sansome (F.-W.) et Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 1935.

172. Chakraborty (R.-K.). — *Indian Jour. Med. Research.*, 1935, 23, p. 347.

173. Damodaran (M.) et Srinivasan (M.). — *Current Sci.*, 1935, 3, p. 553. — *Proc. ind. Acad. Sci.*, sect. B, 1935, 2, p. 377.

174. Baumann (E.-J.) et Metzger (N.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1933, 30, p. 1268.

175. Giroud (A.), Leblond (C.-P.), Ratsimamanga (A.-R.) et Gero (E.) — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1938, 20, p. 1079.

Giroud (A.), Rabinowicz (M.) et Hartmann (E.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1938, 20, p. 1097.

176. Bracci-Torsi (H.). — *Ottalm*, 1935, 42, p. 80.

177. Von Euler (H.) et Klussmann (R.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 219, p. 215 et *ibid.* 1933, 217, p. 167.

178. Mendive (J.-R.) et Deulofeu (V.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1935, 236, p. 208.

179. Neuweiller (W.). — *Schweiz. Med. Woch.*, 1935, 65, p. 539.

180. Huszak (S.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 219, p. 275 et *ibid.* 1933, 222, p. 229.

181. Zimmet (D.) et Dubois-Ferrière (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123, pp. 654 et 798.

182. Muller (K.-H.), Buschke (W.), Gurewitsch (A.) et Bruhl (F.). — *Klin. Woch.*, 1934, 13, p. 20.

183. Plaut (F.) et Bulow (M.). — *Klin. Woch.*, 1934, 11, p. 1744 et *ibid.* 1935, 14, p. 276.

184. Plaut (F.), Bulow (M.) et Pruckner (F.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1935, 234, p. 131.

185. Koldajew (B.-M.) et Gelman (R.-M.). — *Ukrain biochem. Jour.*, 1936, 9, p. 655. — *In Chem. Zentr*, 1937, 1, p. 3015.

186. Jacobsen (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 118, p. 924.

187. Demole (V.), Cahen (P.) et Pfaltz (H.). — *Klin. Woch.*, 1935, 14, p. 966.

188. Zimmet (D.) et Sauser-Hall (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123, p. 584.

189. Glick (D.) et Biskind (G.-R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1936, 114, p. 1.

190. Giroud (A.), Ratsimamanga (A.-R.), Rabinowicz (M.) et Chalopin (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, n° 1.

191. Clayton (M.-M.) et Keith (J.-D.). — *Science*, 1936, 84, p. 377.

192. Von Euler (H.) et Malmberg (M.). — *Arch. Augenheilk.*, 1935, 109, p. 225. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1935, 235, p. 97.

193. Melka (J.). — *Pflügers Arch.*, 1936, 237, p. 216.

194. Policard (A.) et Ferrand (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 200 et *ibid.* 1936, 123, p. 1081.

195. Yavorsky (M.), Almaden (P.) et King (C.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1934, 106, p. 525.

196. Bezssonoff (N.) et Stoerr (E.). — *Ztschr. f. Vitaminfrsch.*, 1936, 5. p. 193.

197. Giroud (A.) et collaborateurs. — *Presse Médicale*, 1937, 99.

198. Plaut (F.) et Bulow (M.). — *Ztschr. Neurol.*, 1935, 153, p. 182. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1935, 236, p. 241.

199. Lund (H.) et Lieck. — *Skand. Arch. f. Physiol.*, 1936, 74, page 269. — *Klin. Wochem.*, 1937, 1, p. 555.

200. Espil (L.) et Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim. de France*, 1938, 5, pp. 17 et 1532.

201. Meunier (P.), et Raoul (Y.), — Diagnostic chimique des avitaminoses, 1 vol., Masson et C^ie^, éd., Paris, 1942.

202. Schneider (E.) et Widmann (E.).— *Klin Woch.*, 1935, 14, p. 1454.

203. Emmerie (A.). — *Nature*, 1933, 132, p. 315. — *Acta brevia Neerland.*, 1934, 4, p. 141.

204. Stephens (D.-J.) et Hawley (E.-E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1936, 115, p. 653.

205. Gabbe (E.). — *Klin. Woch.* 1934, 13, p. 1389.

206. Bezssonoff (N.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1924, 6, p. 220.

207. Mac Henry (E.-W.) et Reedmann. — *Biochem. Jour.*, 1938, 32, p. 85.

208. Rohmer (P.) et Bezssonoff (N.). — *Zstchr. f. Vitaminfrsch.*, 1942, 12, p. 104.

209. Hamel. — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 1105.

210. Kaschewnik (L.-D.). — *Collected Papers State Med. Inst. Archangel*, 1937, 3, p. 69.

211. Weitzenberg (R.). — *Arch. wiss. prakt.Tierheilk.*, 1938, 73, p. 188.

212. Inantsy (E.). — *Allatorv. Lapok.*, 1937, 60, p. 174.

213. Mirimanoff (A.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, 206, pp. 766 et 1038. — *Rev. de Cytol. et Cytophysiol.*, 1938, 3, p. 119.

214. Martini (E.) et Bonsignore (A.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, 1935, 10, p. 60.

215. Kellie (A.-E.) et Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1936, 30, p. 361.

216. Van Eekelen (M.). — *Biochem. Jour*, 1936, 30, pp. 98 et 2291.

217. Kalnins. — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 93.

218. Young et Mitolo. — *Nature*, 134, 133, p. 572.

219. Kawachi (H.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 225, p. 273.

220. Von Euler (H.) et Martius (C.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 222, p. 65.

221. Dumazert (C.) et Passelaigue (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 1035.

222. Glick (D.) et Biskind (G.-R.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1936, 34, p. 866.

223. Glick (D.) et Biskind (G.-R.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1936, 113, pp. 27 et 427.

224. Müller (A.-K.). — *Nature*, 1933, 132, p. 280.

225. Kotake (Y.) et Nichigaki (M.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1933, 219, p. 224.

226. Jacobsen. — *C. R. Soc. Biol.* 1935, 118, p. 924.

227. Collazo et Santos Ruiz (A.). — *La Medicina Ibera Ann.*, 1935, 19, n° 903.

228. Wolff, Van Eekelen (M.) et Emmerie (A.). — *Acta brevia Neerl.*, 1933, 3, p. 44.

229. Mirsky (J.-A.), Swadesh (S.) et Soskin (G.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1935, 32, p. 1130.

230. Bleyer (B.). — *München Med. Woch.*, 1933, 80, p. 257.

231. Marinesco (G.), Alexianu-Buttu (G.) et Oltéanu (J.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1935, 114, p. 803.

232. Anceaux (P.). — La vitamine C dans le lait, *Thèse de Pharmacie*, Lille, 1939.

233. Kon (S.-K.) et Watson (M.-B.). — *Biochem. Jour.*, 1937, 31, p. 227.

234. De Caro et Spier. — *Quaderni nutrizione*, 1936, 2, p. 171, *in* « Le Lait », 1937, 17, p. 1071.

235. Palladine (O.-K.) et Anoskine (A.-A.). — In *Microbiologie*, 1937, 6, p. 787.

236. Le Henaff (N.). — Comparaison entre la valeur antiscorbutique du lait de vache frais et celle des laits pasteurisés. — *Thèse de Médecine Vétérinaire*, Alfort, 1938.

237. Meulemans (I.-O.) et De Haas (J.-H.). — *Genesk. Tijdschr. Nederland Ind*, 1936, 76, p. 2.987.

238. Ferdinand (H.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, p. 1311.

239. Stoerr (E.). — *Revue Franç. de Pédiatrie*, 1936, 12, p. 427.

240. Kasahara (M.) et Kawashina (K.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, p. 1.278 ; *Z. Kinderheilk*, 1936, 58, p. 191.

241. Moglia (P.). — La vitamine antiscorbutique dans le lait de chèvre. — *Thèse de Médecine Vétérinaire*, Alfort, 1938.

242. Sellig (I.) et King (C.-G.). — *Jour. of Nutrition*, 1936, 11, p. 599.

243. Neuweiller (W.). — *Ztschr, f. Vitaminfrsch.*, 1935, 4, p. 39.

244. Baumann (T.). — *Schweiz. Med. Woch.*, 1937, 67, p. 962.

245. Widenbauer (F.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, p. 94.

246. Whitnath (C.-N.) et Riddell (W.-H.). — *Science*, 1936, 83. p. 162 ; *Journ. of. Dairy Science*, 1936, 19, p. 473 ; in « *Le Lait* », 1938, 18, p. 166.

247. Bezssonoff (N.) et van Wien (H.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1934, 16 p. 1.160.

248. Bolduc (A.). — *Bull. d'Hyg. de la Cité de Montréal*, 1934, vol. 20, n° 6.

249. van Leersum (E.-L.). — *Bull. Soc. Sc. Hyg. Alim.*, 1926, 8, p. 391.

250. Szent-Gyôrgyi (A.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1938, 20, p. 846.

251. Szent-Györgyi (A.). — *Biochem. Jour.*, 1934, 28, p. 1014.

252. Tauber (H.) et Kleiner (I.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1935, 110, p. 211.

253. Wachholder (K.), Podesta (H.) et Bruss. — *Pfluger's Arch.*, 1937, 238, p. 1937.

254. Schultze (M.-O.), Stotz (E.) et King (C.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1938, 122, p. 395.

255. Roe (J.-H.) et Barnum (G.-L.). — *Journ. of Nutrition*, 1936, 11, p. 359.

256. Lemberg (R.), Cortis-Jones (B.) et Norrie (M.). — *Biochem. Jour.*, 1938, 32, pp. 149 et 171.

257. King (C.-G.). — *Physiol. Reviews*, avril 1936, 16, n° 2.

258. Von Euler (H.), Karrer (P.) et Zehender. — *Helv. Chim. Acta*, 1934, 17, p. 157.

259. Purr. — *Biochem. Jour*, 1934, 28, p. 1141.

260. Martinson (E.), Fetissenko (J.), Sokolowa (L.), Solianikowa (V.) et Troitzki (G.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1937, 19, p. 1521.

261. Pantschenko, Jurewicz et Kraut. — *Biochem. Ztschr.*, 1936, 285, p. 407.

262. Rubin (B.-A.) et Artzichovskaja (E.-V.). — *Biochimia*, 1937, 2, p. 952.

263. Arloing (F.), Morel (A.), Josserand (A.) et Perret (M.-J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 1014.

264. Arloing (F.), Morel (A.), Josserand (A.), Thévenot (L.) et Caille (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 5.

265. Holtz (P.) et Heise (R.). — *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.*, 1937, 187, p. 581.

266. Hojer. — *Skand. Arch. Physiol.*, 1925, 46, p. 241.

267. Harrisson (D.-C.). — *Biochem. Jour.*, 1933, 27, p. 1501.

268. Quastel et Wheatley. — *Biochem. Jour.*, 1928, 222, p. 1387. — *Journ. of biol. Chem.*, 1933, 27, p. 1501.

269. Stotz (E.), Karrer (C.), Schultze (M.) et King (C.-G.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1938, 122, p. 407.

270. Bourne (G.). — *Nature*, 1933, 131, p. 874. — *Australian Jour. of exp. biol. med. science*, 1935, 13, pp. 113 et 239.

271. Binet et Weller. — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1936, 18, p. 358.

272. Giroud (A.) et Leblond (C.-P.) — *C. R. Acad. Sc.*, Paris, 1934, 198, p. 850.

273. Glick (D.) et Biskind (G.-R.). — *Science*, 1936, 84, p. 186.

274. Giroud (A.), Ratsimamanga (A.-R.), Leblond (C.-P.) et Rabinowicz (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 899. — *Gynécol. et Obstétr.*, 1937, 35, p. 425.

275. Mouriquand (G.) et Schoen. — *C. R. Acad. Sc.*, Paris, 1933, 197, p. 203.

276. Kramer (P.), Harmann et Brill. — *Amer. Jour. Phyhsiol.*, 1933, 106, p. 611.

277. Miura et Okabe. — *Sc. Papers Inst. Physiol. and Chem. Res. Tokyo*, 1933, 20, p. 145.

278 Parsons. — *Jour. of biol. Chem.*, 1920, 44, p. 587.

279. Lepkowski et Nelson. — *Jour. of biol. Chem.*, 1924, 59, p. 91.

280. Hauge et Carrick. — *Jour. of biol. Chem.*, 1925, 64, p. 111.

281. Wollman et collaborateurs. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, p. 434.

282. Giroud (A.) et collaborateurs. — *Ergeb. d. Vitamin. und Hormonforschung*, 1938, 1, p. 69.

283. Mosonyi (J.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 230, p. 240.

284. Ghosh (A.-R.) et Guha (B.-C.). — *Current Sci.*, 1934, 3, p. 251.

285. Ray (S.-N.). — *Biochem. Jour.*, 1934, 28, p. 996.

286. Kleiner (I.) et Tauber (H.). — *Food Res.*, 1936, 1, p. 369.

287. Laporta et Rinaldi. — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1935, 10, p. 349.

288. Ghosh (A.-R.) et Guha (B.-C.). — *Nature*, 1936, 138, p. 844.

289. Mentzer (C.) et Urbain (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, p. 270.

290. De Caro (L.) et Rovida (E.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1937, 12, p. 686.

291. Lucke (H.). — *Arch. exp. Pathol. Pharmakol.*, 1937, 187, p. 416.

292. Kurihara (K.). — *Sei-i-Kwai Med. Journ.*, 1937, 56, n° 6, p. 875.

293. Rohmer (P.), Bezssonoff (N.) et Stoerr (E.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1934, 3, p. 871.

294. Laporta (M.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1935, 10, p. 318.

295. Widenbauer (F.) et Koschorreck (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1937, 291, p. 209.

296. Rietschel et Mensching. — *Klin. Woch.*, 1939, p. 273.

297. Wachholder, Bancke et Podesta. — *Pflüger's Arch.*, 1939, 241, p. 495.

298. De Caro (L.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1936, 240, p. 179.

299. Giroud (A.), Ratsimamanga (A.-R.), Leblond (C.-P.), Rabinowicz (M.) et Chuc. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 330. — *Jour. de Physiol. et de Pathol. générale*, 1936, 34, p. 437.

300. De Caro (L.) et Giani. — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1934, 228, p. 13.

301. Mawson. — *Biochem. Jour.*, 1935,, 29, p. 569.

302. Mouriquand (G.) et Viennois. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, p. 289.

303. Svirbely (J.-L.). — *Jour. of biol. Chem.*, 1935, 111, p. 147.

304. Mosonyi (J.), — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1936, 242, p. 158 et *ibid.* 1937, 250, p. 132.

305. Nespor. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 427.

306. Plaut (F.) et Bulow (M.). — *Klin. Woch.*, 1935, 14, p. 1318.

307. Taddea (S.) et Runne (H.-J.). — *Ztschr. ges. exp. Med.*, 1938, 103, p. 283.

308. Mosonyi (J.). — *Ber. ges. Physiol.*, 1936, 94, p. 664.

309. Szekessy (W.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1937, 250, p. 175.

310. Kasahara (M.), Nishizawa (Y.) et Hirao (S.). — *Klin. Woch.*, 1937, 16, pp. 1453 et 1618.

311. Ratsimamanga (A.-R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 1134.

312. Galvao et Cardoso. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 119, p. 749.

313. Mouriquand (G.), Sedaillan et Cœur. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 216.

314. Nuzzi. — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1935, 10, p. 715.

315. Lyman et King. — *Jour. Pharmacol. Amer.*, 1936, 56, p. 209.

316. Widenbauer (F). — *Jb. Kinderheilk.*, 1936, 146, p. 297.

317. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *Acta Vitaminologiæ*, 1938, 1, p. 80.

318. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *Arch. de Phys. biol.* (supplément), juin 1941, 15, n° 47.

319. Mentzer (C.). — Contribution à l'étude biochimique de l'acide ascorbique. *Thèse de Pharm. Sup.*, Paris, 1940.

320. Heintz. — *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 1939, 208, p. 1893.

321. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1939, 21, p. 208.

322. Stepp (W.), Schröder (H.) et Altenburger (E.). — *Klin. Woch.*, 1935, 14, p. 933.

323. Billing (L.). — *Pflügers Arch.*, 1935, 235, p. 791.

324. Tislowitz (R.). — *Klin. Woch.*, 1935, 14, p. 1641 et *ibid.* 1936, 15, p. 830.

325. Bruch (H.) et Vasilescu (N.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, pages 490 et 1047.

326. Demole (V.) et Ippen (F.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1935, 235, p. 226.

327. Paal (H.) et Brecht (K.). — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 261.

328. Altenburger (E.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, p. 1129.

329. Cotti (L.) et Larizza (P.). — *Klin. Woch.*, 1936, 15, p. 227.
Cotti (L.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1935, 11, p. 697.

330. Randoin (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 4.

331. Dann et Cowgill. — *Jour. of Nutrition*, 1935, 9, p. 507.

332. Giroud (A.) et Leblond (C.-P.).— *Presse Médicale*, 1935, n° 54.

333. Zilva (S.). — *Biochem. Jour.*, 1936, 30, p. 1419.

334. Göthlin. — *Klin. Woch.*, 1932, p. 1469.

335. Rietschel. — *Deutsch. Med. Woch.*, 1938, 64, p. 1382, *in* « Presse Médicale », 1er mars 1939, p. 49. — *Klin. Woch.*, 1938, 17, p. 1787. *in* « Presse Médicale », 17 mai 1939, p. 100.

336. Javillier (M.). — *Paris Médical*, 1941, n° 17, p. 245.

337. Lecocq (R.). — *Déséquilibres alimentaires, nutritifs et humoraux*, 1 vol. (2e édit.), Vigot, éd., Paris 1939.

338. Lecocq (R.). — *Les Nouvelles Thérapeutiques*, juin 1939, n° 11, p. 3.

339. Lesné (E.). — *Ann. de Clinique et de Pharmacodyn.*, décembre 1936, p. 3.

340. Mouriquand (G.). — *Presse Médicale*, septembre 1931, n° 75. *Journal de Médecine de Lyon*, 1932, p. 103. — *Presse Médicale*, 7 mars 1934 et *ibid.* 27 mars 1935.

341. Mouriquand (G.). — *Ann. de Clinique et de Pharmacodyn.*, janvier 1939, p. 9. — *Presse Médicale*, 18 octobre 1941. — *Vitamines et Carences Alimentaires*, 1 vol., Albin-Michel, éd., Paris, 1942.

342. Holtz (P.). — *Naturwiss.*, 1937, 25, pp. 14 et 251.

343. Abderhalden (E.). — *Fermentforschung*, 1938, 15, p. 522.

344. Schroeder. — *Klin. Woch.*, 1935, 14, pp. 25 et 484.

345. Lotze (H.). — *Deutsch. Med. Woch.*, 1938, 64, p. 477.

346. Jersild (T.). — *Ugeskr. Lœger.*, 1937, 99, p. 1073.

347. Bentsath (A.) et Szent-Györgyi (A.). — *Nature*, 1937, 140, p. 426.

348. Bentsath (A.) et Das (N.-B.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1937, 247, p. 258.

349. Codvelle (E.), Simonnet (H.) et Mornard (J.). — *Presse Médicale*, 26 novembre 1938, n° 95, p. 1745.

350. Fabre (J.). — Contribution à l'étude du métabolisme de la vitamine C chez le vieillard. — *Thèse de Médecine*, Nancy, 1938.

351. Bigwood (E.-J.). — Des méthodes physiologiques objectives d'appréciation des états de précarence, *in* « Exposés de Biochimie Médicale », 1939, 2, p. 32, Masson, éd., Paris.

352. Bigwood (E.-J.). — Directives pour les enquêtes sur la nutrition des populations, publiées par la Section d'Hygiène de la S. D. N., Genève, 1939.

353. Göthlin (G.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1931, 61, p. 225.

354. Göthlin (G.), Friselle et Rundqvist. — *Acta Med. Skand.*, 1937, 92, nos 1 et 3.

355. Dalldorf. — *Amer. Jour. Dis. Child.*, 1933, 46, p. 794.
Dalldorf et Russel. — *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 11 mai 1935, p. 1701.

356. Adant (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123, p. 130.

357. Grenn. — *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1934, 103, p. 4.

358. Baumann et Rappolt. — *Ztschr. Vitaminfrsch.*, 1937, 6, p. 1.

359. Schultzer. — *Acta Med. Skand.*, 1935, 85, p. 563.

360. Armentano. — *Ztschr. gesell. exp. Med.*, 1936, 97, p. 630.

361. Dann et Glavind. — *Nature*, 1939, 143, p. 810.

362. Rotter (H.). — *Nature*, 1937, 139, p. 717. — *Wiener Klin Woch.*, 1938, n° 7. — *Ztschr. Vitaminfrsch.*, 1939, 8, p. 24.

363. Portnoy et Wilkinson. — *British Med. Jour.*, 12 février 1938,

364. Poucher et Stenbenrauch. — *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 1938, 111, p. 302.

365. Harris (L.-J.) et Ray (S.-N.). — *The Lancet*, 1935, 1, p. 71.

366. Harris (L.-J.) et Abbasy. — *The Lancet*, 1937, p. 1429.

367. Harris (L.-J.), Ray (S.-N.), Abbasy et Marrack. — *The Lancet*. 1935, p. 1399.

368. Eddy et collaborateurs. — *Amer. Jour. Public Health*, 1939, 29, p. 42 du supplément.

369. Neuman. — *Klin. Woch.*, 1936, p. 368.

370. Brugsh. — *Deutsch Med. Woch.*, 1934, 60, p. 1203.

371. Schultzer. — *The Lancet*, 1933, 2, p. 789 ; *Acta Med. Skand.*, 1934, 81, p. 113.

372. Banke. — *Munch. Med. Woch.*, 10 août 1934, 31, p. 1240.

373. Boger et Schroeder. — *Munch. Med. Woch.*, 1934, 32, p. 1335.

374. Engelkes. — *Nederl. Tidschr. v. Geneesk.*, 1935, 1, p. 679.

375. Junghaus. — *Klin. Woch.*, 22 juin 1935, p. 899.

376. Stepp. — *Forsch.*, 1935, 11, p. 117 ; *Munch. Med. Woch.*, 1936, p. 357.

377. Vogt (E.). — *Munch. Med. Woch.*, 14 février 1935, p. 263.

378. Hasselbach. — *Deutsch. Med. Woch.*, 1936, n° 23, p. 924.

379. Glanzmann. — *Schweiz. Med. Woch.*, 1937, n° 35, p. 829.

380. Faure-Beaulieu, Cahen et Feld. — *Monde Médical*, 1938, n° 928, p. 931.

381. Schuchard. — *Med. Klinik.*, 1937, n° 46, p. 1522.

382. Kohl. — *Ztschr. Klin. Med.*, 1938, n° 134, p. 133.

383. Heeres. — *Nederl. Tidj. v. Geneesk.*, 1936, 5. p. 278.

384. Dreyfus. — *Bull. Inst. Pasteur*, 1935, 20, p. 995 ; *Presse Médicale*, 1936, 29, p. 589.

385. Carneiro et D'Oliveira. — *Imprensa. Medica.*, septembre 1937, n° 247.

386. Siegert. — *Med. Welt.*, 1937, 21, p. 728.

387. Engelkes. — *The Lancet*, 1935, p. 1285.

388. Koranyi et Bentsath. — *Orvosi Hetilap.*, 1935, 14, p. 378.

389. Baer. — *Monat. f. Ohrenheilkunde*, 1937, 12, p. 1445.

390. Leitner. — *Med. Welt.*, 1933, 36, p. 1302.

391. Daniellq et Iepure. — *Clujul. Med.*, 1937, 3, p. 181.

392. Viallefont (H.), Villard et Diacono. — *Montpellier Méd.*, 1935, 2, p. 244.

393. Randoin (L.) et Michaud. — *C. R. Acad Sc. Paris*, 1932, 194, p. 275.

394. Böger (A.) et Martin (W.). — *Munch. Med.Woch.*, 1935, n° 23.

395. Friend et Hadler. — *News England Jour. of Med.*, 1937, 20, p. 907.

396. Sacrez. — Contribution à l'étude du rôle de la vitamine C dans la thérapeutique des anémies de l'enfant, *Thèse de Médecine*, Strasbourg, 1937.

397. Galinowski, Landsberg et Goreki. — *Medycyna*, 1936, 13, p. 415.

398. Diacono (E.). — L'œil dans les avitaminoses, *Thèse de Médecine*, Montpellier, 1935.

399. Mettier (S.-R.) et Chew (W.-B.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1934, 29, p. 11.

400. Mouriquand (G.). — *Le Journal Médical Français*, numéros spéciaux de décembre 1938 et janvier 1939.

401. Hancke (H.). — *Zbt. Inn. Med.*, 1935, n° 2, p. 128.

402. Ruppe. — *Rev. de Stomato.*, 1934, p. 353.

403. Rinné. — *L'Opinion Dentaire Belge*, mars 1936, n° 3.

404. Vauthier. — *Rev. de Stomato.*, juillet 1938, n° 7.

405. Howe. — *Jour. Amer. Dental. Assoc.*, 1933, 10, p. 755.

406. Iancou (A.), Oprisiu (C.) et Jula (V.). — *Presse Médicale*, juin 1939, n° 47, p. 937.

407. Mouriquand (G.), Pouzet, Schoen et Billy. — *Presse Médicale*, mai 1933, n° 41, p. 845.

408. Fish et Harris. — *British Dent. Jour.*, 1935.

409. Peyrus (J.). — *Courrier Médical*, novembre 1937, n° 47.

410. Strohl. — *Deutsch. Zahnärztl. Woch.*, 1936, n° 3.

411. Schneider (M.). — *Deutsch. Zahnärztl. Woch.*, 1938, n° 17.

412. Kramer (P.). — *Der Deutsche Militarzt.*, 1937, vol. 2.

413. Tourbiers et Buschan. — *Zahnärztl. Rdschau*, 1936, n° 52.

414. Fasoli (G.) et Hoffer (O.). — *Stomatologia Ital.*, 1939, 1, pp. 411 et 508.

415. Stanley (F.) et Glazerbrook (A.-J.). — *The Jour. of the Royal Navy Med. Service, octobre* 1939, p. 340.

416. Dascalu (M.) et Dosios (V.). — *Romania Medicala*, 1938, n°s 15 et 16, in *Praxis*, 1939, n° 6, p. 94.

417. Simici (D.) et Papadopol. — *Ann. de Médecine*, 1939-1940, 46, p. 224.

418. Menschikow. — *Probl. Nutrition*, 1934, p. 66.

419. Hetenyi (G.). — *Klin. Woch.*, 12 octobre 1935, n° 41, p. 1470.

420. Galvan (G.). — *Ann. de Merck*, 1939, 1re partie.

421. Thiele (W.). — *Deutsch. Med. Woch.*, 28 mai 1937.

422. Toullec et Riou. — Congrès Franç. de Méd., 25e session, Marseille, 1938, rapport 2, Masson, éd., Paris.

423. Debray (C.). — *Gaz. Méd. de France*, novembre 1941, n° 21, p. 652.

424. Tanaka (K.). — *Kagoshima Igakkai Zasshi*, 1937, n° 1. ; *in Rev. Inf. Tér.*, 1938, n°s 1 et 9.

425. Chopra (R.-N.) et Ray (S.-N.). — *Ind. Med. Gaz.*, 1939, vol. 74, n° 2.

426. Lueg (W.) et Hammann (G.). — *Med. Welt.*, 1939, n° 4.

427. Evans (W.). — *The Lancet*, 1938, n° 5.971, p. 308.

428. Delamare (J.). — *Gaz. Méd. de France*, 1941, n° 21, p. 641.

429. Thaddea (S.) et Hoffmeister (W.). — *Ztschr. Klin. Med.*, 3 juin 1937.

430. Büller-Souto (A.) et Lima (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, pp. 76 et 79.

431. Büller-Souto (A.) et Lima (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, pp. 763 et 767.

432. Mercier (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, pp. 188 et 297, et *ibid.* 1938, 128, p. 646.

433. Jungeblut (C.-W.). — *Jour Immunol.*, 1937, 33, p. 203.

434. Zilva (S.). — *Jour. Exp. Pathol.*, 1937, 18, p. 449.

435. Polonyi. — *Wien. Med. Woch.*, 1935, n° 25, p. 685.

436. Harde (E.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1934, 199, pp. 618 et 738.

437. Philippe (M.) et Harde (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 121, p. 940.

438. Mouriquand (G.), Sedaillan et Cœur. — *Presse Médicale*, 1935, n° 104, p. 2113.

439. Mouriquand (G.). — *Gaz. Méd. de France*, 1938, n° 9, p. 470.

440. Jeney et Gagyi. — *Deutsch. Med. Woch.*, 10 janvier 1936, n° 2.

441. Policard (A.). — *Montana Medical*, 1938, n° 4, p. 8 ; *Jour. de Médecine de Lyon*, 1938, n° 451, p. 611.

442. Tonutti (E.) et Wallraff. — *Klin. Woch.*, 1938, n° 24, p. 855.

443. Jetter et Bumbalo. — *Amer. Jour. Med. Sc.*, 1938, n° 3, p. 362.

444. Bumbalo. — *Amer. Jour. Dis. Child.*, 1938, 40, p. 1212.

445. Bauer et Vorwek. — *Beitr. Klin. Tuberk. spezif. Tuberkul. Forschg.*, 1938, 91, p. 262.

446. Vaquette. — *Rev. de la Tuberculose*, 1937, n° 4, p. 409.

447. Albrecht. — *Med. Klinik.*, 1938, n° 29, p. 972.

448. Mario Ballan (G.). — *Gior. Med. dell'alto Adige*, 1938, n° 9, p. 539.

449. Hasselbach. — *Schweiz. Med. Woch.*, 1937, n° 37, p. 877 ; *Ztschr. f. Tuberkul.*, 1936, 75, p. 336.

450. Weber (H.). — *Wiener. Klin. Woch.*, 1938, n° 44.

451. Alexander (H.). — *Deutsch. Tuberkul. Blatt.*, 1940, n° 7, p. 125

452. Warns (H.-S.). — *Nederl. Tidj. v. Gen.*, 10 septembre 1938, p. 4426.

453. Tonutti (E.) et Matzner (K.-H.). — *Klin. Woch.*, 1938, 17, p. 63

454. Gànder (J.) et Niederberger (W.). — *Münch. Med. Woch.*, 1936, n° 34, p. 1386 et *ibid.* 1936, n° 51.

455. Harris, Abbasy, Yudkin et Kelly. — *The Lancet*, 27 juin 1936, p. 1488.

456. Mikulowski. — *Thèse de Médecine*, Varsovie, 1938

457. Jezler et Kapp. — *Helv. Med. Acta*, 1936, p. 657.

458. Hochwald (A.). — *Med. Klin.*, 1935, n° 26, p. 863. et *ibid.* 1936, n° 8, p. 268 ; *Deutsch. Med. Woch.*, 1937, n° 5, p. 182.

459. Griebel. — *Med. Klin.*, 1939, n° 47, p. 1510.

460. Bonholtzer. — *Klin. Woch.*, 1936, n° 25, p. 894 ; *Deutsch. Med. Woch.*, 1937, n° 26, p. 1001.

461. Vogl (A.). — *Münch. Med. Woch.*, 1937, n° 40, p. 1569.

462. Schnetz. — *Med. Klin.*, 1937, n° 51, p. 1696.

463. Gunzel et Kroehnert. — *Fortschr. d. Ther.*, 1937, n° 8 ; *in Wien. Med. Woch.*, 1938, n° 19, p. 530.

464. Kondo. — *Tokyo Iji Shinschi*, septembre 1937, n° 3049.

465. Daïnow. — *Ann. Dermatol. et Syphil.*, 1936, n° 9, p. 817.

466. Otani. — *Rev. Jap. de Biol.*, 1936, 30, p. 235.

467. Plate. — *Kinderartzl. Praxis*, 1937, n° 2, p. 70.

468. Robert. — *Schweiz. Med. Woch.*, 1938, n° 21, p. 914.

469. Ormerod et Unkauf. — *Canadian Med. Assoc. Jour.*, 1937, 137, pp. 134 et 268.

470. Kudlac et Storch. — *Wien. Med. Woch.*, 1938, n° 13, p. 363.

471. Muntéanu-Bacau. — *Clujul Medical.*, 1938, n° 5, p. 296.

472. Gairdner. — *British. Med. Jour.*, 1938, n° 4.057, p. 742,

473. Habbasy (M.-A.), Hill (N.) et Harris (L.-J.). — *The Lancet*, 1936, n° 5.911, p. 1413.

474. Falke. — *Jour. of Amer. Med. Assoc.*, 9 septembre 1939, p. 1082.

475. Hall (M.-G.), Darling (R.-C.) et Taylor (G.-J.). — *Ann. of Inter. Med.*, 1939, 13, p. 415 ; *in Jour. Amer. Med. Assoc.*, 25 novembre 1939, p. 1991.

476. Rinehart, Greenberg et Christie. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1936, 35, p. 350.

477. Rinehart, Greenberg, Mettier, Bruckmann et Choy. — *Arch. Inter. Med.*, avril 1938, n° 4, p. 537.

478. Rinehart, Greenberg, Olney et Choy. — *Arch. Inter, Med.*, avril 1938, n° 4, p. 552.

479. Mouriquand (G.), Tête et Viennois. — *Presse Médicale*, novembre 1937, n° 81.

480. Mouriquand (G.), Tête, Wenger et Viennois. — *C. R. Ac. Sc.*, 1937, 205, p. 822.

481. Françon (F.). — *Rev. du Rhumatisme*, juin 1937.

482. Kuhnau. — *Deutsch. Gesell. Rheumatek.*, 14 mars 1937 ; *in Therapie der Gegenwart.*, avril 1937, p. 175.

483. Giroud (A.) et Santa (N.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1939, 21, p. 1312.

484. Giroud (A.), Santa (N.) et Martinet. — *C. R. Soc. Biol.*, 1940, 134, pp. 20 et 100.

485. Laederich, Worms, Payet et Mentzer. — *Bull. Soc. Med. des Hôpitaux de Paris*, 1938, n° 3, p. 133.

486. De Gennes (L.) et Mahoudeau (D.). — Rapport à la Soc. Méd. des Hôpitaux de Paris du 14 février 1941, *in Concours Médical*, 20 juillet 1941, p. 1293.

487. Charif Emani (M.). — Peut-on espérer blanchir les mélanodermies avec la vitamine C? *Thèse de Médecine*, Paris, 1936.

488. Mahoudeau (D.). — *Gaz. Méd .de France*, 1941, n° 20, p. 594.

489. Leitao. — *O. Hospital*, Rio-de-Janeiro, août 1938, vol. 14, n° 2, p. 355.

490. Bartelheimer (H.). — *Med. Welt.*, 28 janvier 1939, *in Gaz. Méd. de France*, 1939, n° 8, p. 503.

491. Borsetti (N:). — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1938, 13, p. 243

492. Vlcek (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, p. 114.

493. Giedosz (B.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 1036 et *ibid.* 1938, 129, p. 339.

494. Versari (A.). — *Gior. Ital. Derm. et Sif.*, 1936, 77, p. 63, *in Ann. Derm. Syph.*, 1936 n° 6, p. 635.

495. Fischer (G.) et Œhme (C.). — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 1453.

496. Fischbach (H.) et Terbruggen (A.). — *Virchows Arch.*, 1938, 301, p. 186.

497. Lohr. — *Klin. Woch.*, 1935, p. 1125 ; *Münch. Med. Woch.*, 1936, p. 826 ; *Med. Welt.*, 1937, n° 4, p. 111.

498. Sendrail (M.). — *Gaz. Méd. de France*, 1938, n° 9, p. 483.

499. Lewis. — *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, 1938, vol. 63, n° 1, p. 31.

500. Bersot (H.). — *Ann. Med. Psych.*, février 1936, p. 187.

501. Thorpe (F.-T.). — *Jour. of Mental Science*, 1938, n° 352, p. 788.

502. Altmann (O.) et Goldhammer (H.). — *Klin. Woch.*, 1937, n° 51, p. 1793.

503. Demole (V.). — *Schweiz. Med. Woch.*, 1936, n° 29.

504. Lucksh (F.). — *Wien. Klin. Woch.*, 1940, n° 49, p. 1009.

505. Kramer (P.). — *Psych. Neurol. Woch.*, 1937, n° 43.

506. Merland (A.) et Ollivier (H.). — *Concours Méd.*, 19 fév. 1939, n° 8 ; *Gazette des Hôpitaux*, 1939, n° 39, p. 689.

507. Rondepierre. — *Gaz. Méd. de France*, 1941, n° 21, p. 621.

508. Schnetz (H.). — *Med. Welt.*, 1939, n° 10, *in Rev. des Progrès Thér.*, 1939, 6, p. 192.

509. Gordonoff et Ludwig. — *Ztschr. f. Krebsf.*, 1938, 47, pp. 5 et 421.

510. Fodor et Kunos. — *Ztschr. f. Krebsfrsch.*, 1933-1934, 40, p. 67.

511. Arloing (F.), Morel (A.) et Josserand (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 118, p. 551, et *ibid.* 1935, 120, pp. 201 et 205 ; *C. R. Acad. Sc.*, août et octobre 1935, *ibid.* Février et décembre 1936, mars 1937.

512. Bérard (L.). — *Lyon Chirurgical*, mai-juin 1936, 33, p. 315.

Bérard (L.), Morel (A.), Arloing (F.), Josserand (A.) et Perrot (L.). — *C. R. Acad. Méd.*, 28 mars 1939 *in Concours Médical*, mai 1939, n° 20.

513. Franta (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, p. 110.

514. Muller (H.-K.). — *Klin. Woch.*, 1935, n° 42, p. 1498 ; *Rev. génér. d'Ophtalmol.*, 1939, n° 2, p. 162.

515. Pavia (J.). — *Med. Welt.*, 1938, n° 20, p. 714.

516. Dubois-Poulsen. — *Presse Médicale*, 1939, n° 55, p. 1108.

517. Silva (L.) et Novaes (J.-L.). — *British Med. Jour.*, 1938, n° 4.024, p. 31.

518. Weistein (P.). — *Arch. Augenheilk.*, 1935, 109, p. 221 ; *Med. Welt.*, 1937, n° 39, p. 1552.

519. Pluvinage (R.). — *Gaz. Méd. de France*, 1941, n° 20, p. 609.

520. Bezssonoff (N.). — *Les vitamines*, in *Traité d'Ophtalmologie*, tome 3, p. 597, Masson, édit., Paris, 1939.

521. Ravina (A.). — *Presse Médicale*, 28 avril 1937, n° 34.

522. Velhagen Jr. (K.). — *Fortschr. Therap.*, 1938, 9, p. 487.

523. Viallefont (H.). — *Montpellier Méd.*, 1935, n° 3, p. 328.

524. Duke-Elder (S.). — *Canadian Med. Assoc. Jour.*, 1938, 39, p. 419.

525. Randoin (L.) et Mazoué (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 122, p. 1184, et *ibid.* 1937, 123, p. 47 ; 1937, 126, p. 991.

526. Mazoué (H.). — *Arch. d'Anat. microsc.*, 1937, 33, p. 129.

527. Drigalski (W.). — *Klin. Woch.*, 1934, n° 38, p. 1354.

528. Tencho (F.). — *Klin. Woch.*, 1934, n° 42, p. 1511.

529. Schade (A.). — *Klin. Woch.*, 1935, n° 14, p. 60 ; *Quaterly Jour. of Pharm. and Pharmacol.*, 1935, 2, p. 277.

530. Cornbleet (Th.). — *Arch. of Derm. Syph.*, 1937, 35, p. 471.

531. Hoff (F.). — *Deutsch. Med. Woch.*, 1936, n° 4, p. 129.

532. Kahler (H.) et Lacroix (V.). — *Klin. Woch.*, 1935, n° 52, p. 1851, in *Presse Médicale*, 1936, n° 19, p. 51.

533. Duvoir-Pollet, Herrenschmidt et Neret-Cauchy. — *Presse Médicale*, 1937, n° 39, p. 737.

534. Schroeder (H.) et Einhauser (M.). — *Münch. Med. Woch.*, 1936, n° 23, p. 923, in *Annales de Merck*, 1937, 4e partie, p. 405.

535. Layani, Ravina, Donnart et Oreistein. — *Bull. Soc. Med. Hôpitaux de Paris*, 1935, n° 34, p. 1782.

536. Lutz (W.). — *Schw. Med. Woch.*, 1935, n° 49, p. 1169.

537. Reiss (F.). — *Acta Dermatol.*, 1937, 30, p. 1, in *Presse Médicale*, 1938, n° 46, p. 96 ; *Chinese Med. Jour.*, 1938, 53, p. 141, in *The Prescriber*, 1938, 10, p. 310.

538. Rostenberg (A.). — *Arch. Dermat. et Syph.*, 1935, 31, p. 924.

539. Welcker. — *Dermat. Woch*, 1940, 111, n° 30, p. 639.

540. Einhauser (M.). — *Klin. Woch.*, 1938, n° 4, p. 127 ; *Münch. Med. Woch.*, 1939, n° 12.

541. Hasimoto (M.), Kitamura (S.) et Suzuki (S.). — *Jour. Orient. Méd.*, 1938, 28, p. 20.

542. Hochwald (A.). — *Ztschr. exp. Med.*, 1935, 97, p. 431 et *ibid.* 1936, 98, p. 578.

543. Pacheco (G.) et Para (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, p. 419

544. Ungar (G.), Parrot (J.-L.) et Levillain (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, p. 1015.

545. Yoshikawa (K.). — *Nagasaki Igakkai Zassi*, 1939, 18, p. 141, in *Presse Médicale*, 1939, n° 37, p. 94.

546. Schafer (W.). — *Ztschr. f. Immunitätsforsch.*, 1937, 91, p. 385.

547. Vauthey (M.). — *La Pratique Méd. Franç.*, 1937, n° 3, p. 107 et *ibid.* 1938, n° 2, p. 70.

548. Dainow (I.). — *Ann. Dermat et Syph.*, 1935, n° 9, p. 830 ; *Presse Médicale*, 1937, n° 94, p. 1670 ; Congrès de l'Union Thérapeutique, Berne, mai 1939.

549. Miyao (I.). — *Bull. Nav. Med. Ass. Japan.*, 1938, 27, p. 2.

550. Giroud (P.) et Giroud (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, p. 339.

551. Lima (P.-A.). — *Ann. Fac. Med. Saô Paulo*, 1937, 13, p. 291.

552. Weitzenberg (R.). — *Arch. wiss. prakt. Tierheilk*, 1938, 73, p. 188.

553. Takahasi (Z.). — *Nagoya Jour. Med. Sc.*, 1938, 12, p. 50.

554. Scharwtzer (K.). — *Monatsschr. Kinderheilk*, 1938, 72, p. 208.

555. Diacono (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 125, p. 833.

556. Jusatz (H.-J.). — *Ztschr. f. Immunitätsforsch.*, 1936, 88, p. 472

557. Madison (R.-R.)et Manwaring (W.-H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, 37, p. 402.

558. Wüllner (W.). — *Münch. Med. Woch.*, 1938, 85, p. 785.

559. Messina (L.) et Verga (G.). — *Gior, Batteriol. Immunol.*, 1937, 19, p. 850.

560. Ecker (E.-E.), Pillemer (L.), Martiensen (E.-W.) et Wertheimer (D.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1938, 123, p. 351 et 359.

561. Ecker (E.-E.), Pillemer (L.), Wertheimer (D.) et Gradis (H.). — *Jour. of. Immunol.*, 1938, 34, pp. 19, 39 et 45.

562. Cotrufo (P.). — *Gior. Batteriol. Immunol.*, 1937, 18, p. 291.

563. Svirbely (J.-L.). — *Biochem. Jour.*, 1938, 32, p. 467.

564. Borsetti (N.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim*, 1938, 13, p. 248.

565. Pfeiffer (C.) Arnove (I.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, 37, p. 467.

566. Holmes (H.-N.), Campbel (K.) et Amberg (E.-J.). — *Jour. Med. Amer. Assoc.*, 7 octobre 1939, p., 1444.

567. Lauber (H.-J.), Dumke (H.) et Patzschke (A). — *Ztschr. exp. Med.*, 1937, 102, p. 1.

568. Daïnow (I.) et Zimmet (D). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, p. 899.

569. Piesocki. — *Thèse de Médecine*, Genève, 1935.

570. Landsfisch (S.). — *Polska Gaz. Lekarsk*, 18 juillet 1937, p. 575, in. — *Jour. Med. Amer. Assoc.*, 4 septembre 1937, p. 834.

571. Montesano (V.). — *Giorn. Ital. Derm. Sifil.*, 1938, 79, p. 1031.

572. Bise (E.). — *Rev. Med. Suisse Romande*, 1938, n° 10, p. 603.

573. Falconer (E.-H.), Epstein (N.-N.) et Mills (E.-S.). — *Arch. Int. Med.*, 1940, in *Amer. Jour. Syph. Gon. et Ven. Dis.* 1941, n° 3, p. 375.

574. Friend (D.-G.) et Marquis (H.-H.). — *Amer. Jour. Syph. Gon. et Ven. Dis.*, 1938, n° 2, p. 239.

575. Durel (P.). — *Bull. Soc. franç. Dermat. et Syph.*, 1937, n° 6, *Gaz. Med. de France*, 1941, n° 21, p., 626.

576. Cormia (F.-E.). — *Canad. Med. Assoc. Jour.*, 1937, n° 4, p. 392.

577. Leibowitz (J.) et Guggenheim (K). — *Ztschr. f. Vitaminforsch*, 1938, 1939, in *Année Biol.*, 1941, 17, p. 70.

578. Sande (A.). — *Klin. Woch*, 1938, n° 50, p. 1762.

579. Gennerich (W. et K.). — *Dermatol. Woch*, 1938, n° 20.

580. Dumazert (C.) et Grebus (C.). — *Marseille Médical*, 1940, n° 15, p. 561.

581. Bénech (J.). — *Concours Médical*, Avril 1938, p. 1121.

582. Rosenberg (W.-A.). — *Arch. of Dermat. and Syph.*, juin 1938.

583. Hochwald. — *Zent. Inn. Med.*, 1935, 56, p. 769.

584. Epstein. — *Schw. Med. Woch.*, 1936, n° 45.

585. Hagiesco (D.), Bazavan (C.), Criscota (M.) et Cioranesco (M.). — *Presse Médicale*, 28 septembre 1938, n° 78.

586. Michelet (L.). — *Les Sciences Médicales*, 31 mai 1939, p. 130.

587. De Rezende (J. F.). — *Gynécologie et Obstétrique*, 1939, 40, p. 322.

588. Torok et Neufeld. — *Klin. Woch.*, 21 mars 1936, n° 12.

589. Doxiades (Th.). — *Deutsch. Med. Woch.*, 1939, n° 6, p. 217.

590. Dalheim (L.). et Guimaraes. — *Ann. Brasileir. de Gyn*, 1938, p. 18, in. *Gynécologie et Obstétrique*, 1939, 40, p. 377.

591. Babonneix (L.). — *Gazette des Hôpitaux*, 1939, n° 26, p. 448.

592. Wachholder (K.). — *Klin. Woch.*, 1936, n° 17, p. 593.

593. Lévine (S.), Marples (E.) et Gordon (H.). — *Science*, 29 décembre 1939, p. 620.

594. Uzan (H.). — *Les carences en vitamines chez le vieillard*, 1 vol., Vigot, éd., Paris, 1938.

595. Armentano (L.) et Bentsath (A.). — *Klin. Woch.*, 31 octobre 1936.

596. Proto (M.). — *Ann. Ital. Chirurg.*, 1936, 15, p. 31, in. *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 1936, 107, p. 627.

597. Bastien (J.). — *Rev. des Progrès Thérap.*, 1938, n° 4, p. 98.

598. Ratsimamanga (A. R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, n° 34, p. 1134.

599. Widenbauer (F.). — *Klin. Woch.*, 1936, n° 15, p. 815 et 1158.

600. Wurmser (R.) et Rapkine. — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, p. 989.

601. Reiss et Nordmann. — *Arch. Physiol. Biol.*, 1935, 12, p. 1.

602. Reiss, Nordmann et Bezssonoff. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123, p. 1196.

603. *Revue Pharmacothérapeutique*. — *Ann. de Merck*, 1937, quatrième partie, p. 451.

604. Castrovilli (G.). — *La Medicina del Lavoro*. — 4 avril 1937, in. *Annales de Merck*, 1937, quatrième partie, p. 480.

605. Hermann (L.). — *Deutsch. Zahnarztl. Woch.*, 1937, n° 6, p. 127.

606. Holst (A.) et Frohlich (T.). — *Jour. of. Hygiène (Cambridge)*, 1907, 7, p. 634; *Ztschr. f. Hyg. und. Infektionskraulch (Leipzig)*, 1913, 75, p. 334.

607. Givens (M. H.) et Cohen (B.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1918, 36, p. 127.

608. Lewis (H. B.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1919, 40, p. 91.

609. Hart (E. B.), Steenbock (H.) et Ellis (N. R.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1920, 42, p. 383.

610. Carey (W. C.) et Haugh (S. M.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1925, 63, p. 115.

611. Mills et Innes. — *The Lancet*, 1932, 223, p. 235.

612. Delft. — *Biochem. Jour.*, 1918, 12, p. 416 et *Ibid.*, 1920, 14, p. 211.

613. Key et Elphick. — *Biochem. Jour.*, 1931, 25, p. 888.

614. Westin. — *Ztschr. Vitaminfrsch.*, 1933, 2, p. 1.

615. Lund (H.), Spur (B.) et Friderica (L.-S.). — *Biochem. Jour*, 1934, 28, p. 1825.

616. Shermann, La Mer et Campbell. — *Jour. Amer. Chem. Soc.*, 1922, 44, p. 165.

617. Bezssonoff (N.). — *Bull. Soc. Chim. Bio*, 1927, 9, p. 568.

618. Randoin (L.) et Lomba (L.). — *Bull. Soc. Chim. Bio*, 1923, 5, p. 806.

619. Roe (J.-H.). — *Science*, 1934, 80, p. 561.

620. Pitarelli (E. et A.). — *Biochem. Terap. sper*, 1935, 22, p. 100.

621. Medes (G.). — *Biochem. Jour.*, 1935, 29, p. 2251.

622. Wedgerwood (P.-E.) et Ford (F.-L.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1924, 6, p. 217.

623. Bezssonoff (N.), Delire (A.) et Van Wien (H.). — *Bull Soc. Chim. Bio*, 1934, 16, p. 1132.

624. Fujita (A.), Iwatake (D.) et Myata (T.). — *Biochem Ztschr.*, 1935, 277, p. 296.

625. Bezssonoff (N.) et Woloszyn (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 124, p. 353.

626. Bezssonoff (N.). — *C. R. Soc. Biol*, 1935, 118, p. 1088.

627. Robertson (E.-B.). — *Chemistry and Industry*, 1934, 53, pp. 277 et 953.

628. Shinohara (K.) et Padis (K.-F.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1936, 112, p. 697.

629. Yavorsky (M.), Almaden (P.) et King (C.-G.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1934, 106, p. 525.

630. Emmerie (A.) et Van Eêkelen (M.). — *Biochem. Jour.*, 1934, 28, p. 1153.

631. Dewjatnin (W.-A.) et Doroschenko (W.-B.). — *C. R. Acad. Sc. de l'U. R. S. S.*, 1935, 3, p. 177 ; in *Biochem. Ztschr.*, 1935, 280, p. 118.

632. Mack (G.-L.) et Tressler (D.-K.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1937, 118, p. 735.

633. Strohecker et Vaubel. — *Angew. Chem.*, 1936, 49, p. 666.

634. Bukin (V.-N.). — *Trudy Prikl. Bot. in pr. III. Physiol. Biochem. and Anat. of Plants. Nr. II*, 5, 25, *u. engl. zussammen fassung*, 25, 1935 (Russick).

635. Manceau (P.), Policard (A.) et Ferrand (M.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1936, 18, pp. 1369 et 1623.

636. Mindlin (R.) et Butler (A.). — *Jour. Biol. Chem.*, 1938, 122, p. 673.

637. Vinet (A.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1941, 23, p. 354.

638. Musulin et King. — *Jour. Biol. Chem.*, 1936, 116, p. 409.

639. Martini (E.) et Bonsignore (A.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1934, 9, p. 388 ; *Biochem. Ztschr.*, 1934, 273, p. 170.

640. Neuweiler (W.). — *Klin. Woch.*, 1936, n° 15, p. 854.

641. Lund (H.) et Lieck (H.). — *Skand. Archiv. f. Physiol.*, 1936, 74, p. 269 ; *Nature*, 1936, 137, p. 784 ; *Klin. Wochem.*, 1937, 1, p. 555.

Lund (H.). — *Klin. Wochem.*, 1937, 2, p. 1085.

642. Ammon (R.) et Hinsberg (K.). — *Klin Woch.*, 1936, 15, p. 85 ; *Biochem. Ztschr.*, 1936, 288, p. 102.

643. Hinsberg (K.). — *Biochem. Ztschr.*, 1937, 290, p. 125.

644. Policard (A.) et Ferrand (M.). — *Klin. Woch.*, 1937, 16, pp. 308 et 347.

645. Wachholder (K.) et Podesta (H.). — *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1936, 239, p. 149.

646. Wachholder (K.) et Hamel (P.). — *Klin. Woch.*, 1937, 17, p. 10.

647. Policard (A.), Ferrand (M.) et Arnold (E.). — *Bull. Soc. Chim. Bio.*, 1938, 20, p. 155.

648. Wahren (H.). — *Klin. Woch.*, 1937, 16, p. 1496.

649. Zimmermann (W.). — *Klin. Woch.*, 1938, 17, n° 49 (3 décembre 1938).

650. Falke. — *Klin. Wochem.*, 1939, 1, p. 842.

651. Polonowski (M.) et Degrez (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, 207, p. 685.

652. GATET, GÉNEVOIS et ESPIL. — *Bull. Soc. Chim. de France*, 1938, 5, p. 472.

653. GATET, MANDILLON et ESPIL. — *Bull. Soc. Chim. de France*, 1939, 6, p. 1188.

THÈSES ET OUVRAGES GÉNÉRAUX

Histoire et Conséquences pratiques de la découverte des vitamines, par C. FUNK. — Vigot, Paris, 1924.

Les données et les inconnues du problème alimentaire, par L. RANDOIN et H. SIMONNET. — Les Presses Universitaires de France, Paris, 1927.

L'œil dans les avitaminoses, *Thèse de Médecine*, par E. DIACONO. — Montpellier, 1935.

Pharmacie Chimique, par A. LESPAGNOL. — Vigot, Paris, 1936.

Etude critique de quelques méthodes chimiques de dosage de l'acide ascorbique, *Thèse de Pharmacie*, par M. FERRAND. — Lyon, 1936.

L'acide ascorbique et son rôle en thérapeutique, *Thèse de Médecine*, par A. BEASSE. — Paris, 1936.

L'acide ascorbique dans les tissus et sa détection, par A. GIROUD et C.-P. LEBLOND. — Hermann et C°, Paris, 1936.

Peut-on espérer blanchir les mélanodermies avec la vitamine C ? *Thèse de Médecine*, par M. CHARIF EMANI. — Paris, 1936.

Vitamins contents of foods, par E.-P. DANIEL et H.-E. MUNSELL. — 1 vol. U. S., dépt. of Agriculture Miscell. Public n° 275. — Washington, juin 1937.

Tables de composition des aliments précédées des vues actuelles sur le problème de l'alimentation, par L. RANDOIN. — Hermann et C°, Paris, 1937.

Contribution à l'étude du rôle de la vitamine C dans la thérapeutique des anémies de l'enfant, *Thèse de Médecine*, par SACREZ. — Strasbourg, 1937.

Vitamines des aliments, par M. UZAN. — Baillière, Paris, 1938.

La Chimie des vitamines et des hormones, par J. SIVADJIAN (2e édition). — Gauthier-Villars, Paris, 1938.

Sixième conseil de chimie de l'Institut Solvay (Vitamines et Hormones). — Gauthier-Villars, Paris, 1938.

Les carences en vitamines chez le vieillard, par H. Uzan. — Vigot, Paris, 1938.

Comparaison entre la valeur antiscorbutique du lait de vache frais et celle des laits pasteurisés, *Thèse de Médecine Vétérinaire*, par N. Le Hénaff. — Alfort, 1938.

La vitamine antiscorbutique dans le lait de chèvre, *Thèse de Médecine Vétérinaire*, par P. Moglia. — Alfort, 1938.

Contribution à l'étude du métabolisme de la vitamine C chez le vieillard, *Thèse de Médecine*, par J. Fabre. — Nancy, 1938.

Les vitamines, par L. Randoin et P. Le Gallic. — Hermann et C°, Paris, 1939.

Les vitamines, par L. Randoin et H. Simonnet (3me édition). — Armand-Colin, Paris, 1939.

Déséquilibres alimentaires, nutritifs et humoraux, par R. Lecoq (2me édition). — Vigot, Paris, 1939.

La vitamine C dans le lait, *Thèse de Pharmacie*, par P. Anceaux. — Lille, 1939.

Exposés annuels de biochimie médicale, publiés sous la direction de M. Polonowski, première et deuxième séries. — Masson et C°, Paris, 1939.

Contribuution à l'étude biochimique de l'acide ascorbique, *Thèse de Pharmacien Supérieur*, par C. Mentzer. — Paris, 1940.

Traité de Physiologie normale et pathologique, publié sous la direction de MM. les Professeurs Roger et Binet, Tome XII (supplément). — Masson et C°, Paris, 1940.

Les vitamines, par S. Gallot. — Les Presses Universitaires de France, Paris, 1941.

Chimie organique biologique, par M. Polonowski et A. Lespagnol. — Masson et C°, Paris, 1941.

Eléments de Biochimie médicale, par M. Polonowski. — Masson et C°, Paris, 1941.

La vitamine C, Conférence faite au Centre de Perfectionnement Technique, le 6 janvier 1941, par P. Meunier. — Centre de Documentation Chimique éd., Paris, 1941.

Chemische und Physikalische Vitaminbestimmung Methoden, par G. Stirner. — F. Enke, éd., Stuttgart, 1941.

Le diagnostic chimique des avitaminoses par P. Meunier et Y. Raoul. — Masson et C°, Paris, 1942.

Vitamines et Carences alimentaires, par G. Mouriquand. — Albin-Michel, Paris, 1942.

Vu, Clermont-Ferrand, le 20 janvier 1943

Le Président du Jury :

P. CORDIER.

VU ET APPROUVÉ :

Clermond-Ferrand, le 24 janvier 1943

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

A. SARTORY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Clermont-Ferrand, le 26 janvier 1943

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université

Pour le Recteur,

Le Vice-président du Conseil de l'Université

A. DANJON.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 7

CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE 11

CHAPITRE II. — CONSTITUTION CHIMIQUE 17

Isolement de la vitamine C 17
Structure de l'acide ascorbique 20

CHAPITRE III. — PRÉPARATION 27

Extraction 27

Méthode de Bezssonoff 27
Méthodes de Zilva 28
Méthode de Svirbely et Szent-Györgyi 30
Méthode de Banga et Szent-Györgyi 31

Synthèses 36

Méthode de Reichstein et d'Haworth 36
Méthode de Micheel, Reichstein et d'Haworth 41
Méthode d'Helférich et Peters 48

CHAPITRE IV. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES 51

Propriétés physiques 51

Propriétés chimiques 53

Caractère acide 53
Action de l'hydrogène 53
Action des cétones 54
Action de l'ortho-phénylène diamine 54

Action du diazométhane 54
Action de la phénylhydrazine..... 56
Oxydation 58
oxydation chimique 58
oxydation physico-chimique 61
oxydation diastasique 61
Existence d'une forme oxydée intermédiaire entre la vitamine C et l'acide déhydroascorbique 62
Pouvoir réducteur 65
Pouvoir catalytique 66
Fermentescibilité 66
Stabilité 67
Action de la lumière 67
Action de la chaleur..... 68
Réactions colorées 68
Remarque sur l'acide déhydroascorbique. 70

CHAPITRE V. — DOSAGE DE LA VITAMINE C..... 73

MÉTHODES BIOLOGIQUES 73

MÉTHODES CHIMIQUES 75

Méthodes diverses 76

Méthodes basées sur la réduction des complexes tungstiques..... 77
Méthode de Bezssonoff..... 77
Méthode de Grace Medes..... 82
Méthode de Laporta..... 83
Méthode de Fujita, Iwatake et Miyata 83

Méthodes basées sur la réduction du 2-6 dichlorophénol-indophénol... 85
Méthode de Tillmans..... 85
Méthode de Meunier..... 89

Méthodes basées sur la réduction photochimique du bleu de méthylène.. 97
Méthode de Martini et Bonsignore..... 97
Méthode de Mentzer et de Vialard-Goudou 99
Méthode de Zimmermann..... 102
Méthode de Mentzer..... 103

Méthode basée sur la formation d'une hydrazone 107
Méthode d'Espil et Genevois..... 107
Méthode diastasique 109
Méthode de Tauber et Kleiner..... 109
Méthodes physiques 110
Méthode de J.-A. de Loureiro..... 111
Méthode de Chevallier et Choron..... 113
Méthodes histochimiques 115
Méthode de Glick..... 115
Méthode de Giroud et Leblond..... 116
Modes d'extraction et de défécation..... 118
Considérations et conclusions..... 119

Chapitre VI. — RÉPARTITION..... 121

Règne végétal 122
La vitamine C dans les conserves..... 125
Règne animal 136
Le taux normal en acide ascorbique..... 136
L'acide ascorbique chez l'homme..... 148
L'acide ascorbique dans le lait..... 148

Chapitre VII. — PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES 157

Structure et activité 157
Potentiel d'oxydo-réduction 161
Rôle de l'acide ascorbique dans les oxydations et dans divers processus diastasiques.... 162
Formes de l'acide ascorbique dans l'organisme 165
Répartition 166
Métabolisme de l'acide ascorbique..... 168
Origine chez l'organisme non carençable. 168
Origine chez l'organisme carençable..... 170
Fixation et protection..... 171
Catabolisme 171
Elimination 173
Propriétés physiologiques 174

Chapitre VIII. — LA VITAMINE C EN THÉRAPEUTIQUE. — PHARMACOLOGIE 175

Besoins en vitamine C..... 175
Avitaminose 176
Hypovitaminose 177
Paravitaminose 177
Causes de l'avitaminose et de l'hypovitaminose 178
Complexité de la carence : vitamine P..... 178
Importance des états de précarence..... 179
Diagnostic des états de précarence..... 180
La vitamine C en thérapeutique..... 183

Scorbut, maladie de Barlow..... 184
Hémorragies, états hémorragipares 184
Affections globulaires, anémies 186
Cardiopathies 186
Dystrophies osseuses et dentaires..... 187
Troubles de l'appareil digestif 188
Maladies infectieuses 188
Vitamine C et glandes..... 193
Psychiâtrie 195
Cancer 195
Ophtalmologie 196
Dermatologie 197
Manifestations allergiques 198
Grossesse, allaitement, nourissons..... 201
Fatigue, convalescence, vieillesse 202
Indications diverses 203

Formes médicamenteuses 203
Posologie et mode d'administration 204
Tolérance 206

Conclusions 207

Bibliographie 209

Saint-Etienne. — Imprimerie de « La Loire », place Marengo, 16.